



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



UNIVERSIDAD POLITÉCNICA DE VALENCIA

ESCUELA TÉCNICA SUPERIOR DE INGENIERÍA DEL
DISEÑO

TRABAJO DE FIN DE GRADO

Síntesis y caracterización de propiedades físico-químicas de soportes celulares porosos basados en ácido poliláctico para aplicaciones de ingeniería tisular

Realizado en el Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular de la Universidad
Politécnica de Valencia



Arnau Onrubia i Rocher

Directora: Roser Sabater i Serra

Julio 2016

ÍNDICE

1	AGRADECIMIENTOS	4
2	OBJETIVOS	5
3	MOTIVACIÓN	6
4	INTRODUCCIÓN	7
4.1	INGENIERÍA TISULAR	7
4.2	BIOMATERIALES	8
4.3	SOPORTES CELULARES POROSOS (SCAFFOLDS)	9
4.4	ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO COMO BIOMATERIAL PARA SCAFFOLDS	10
4.5	LIOFILIZACIÓN	10
4.6	FORMACIÓN DE POROS	12
4.7	DIRECCIONALIDAD DE POROS	13
5	PREPARACIÓN DE <i>SCAFFOLDS</i> Y TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	14
5.1	MATERIALES	14
5.1.1	NITRÓGENO LÍQUIDO	14
5.1.2	ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO (PLLA)	15
5.1.3	DIOXANO	16
5.1.4	CLORURO DE SODIO	16
5.1.5	AGUA	17
5.1.6	ETANOL	18
5.2	MÉTODOS	20
5.2.1	PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES	20
5.2.2	OBTENCIÓN DE <i>SCAFFOLDS</i>	21
5.3	TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN	24
5.3.1	MÁQUINA DE MICRO-ENSAYOS MECÁNICOS	24
5.3.2	TERMOGRAVIMETRÍA (TGA)	26
5.3.3	CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	29
5.3.4	MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM)	31
5.3.5	MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE EMISIÓN DE CAMPO (FESEM)	33
5.3.6	DENSIDAD Y POROSIDAD	34
6	ANÁLISIS DE RESULTADOS	38
6.1	MÁQUINA DE MICRO-ENSAYOS MECÁNICOS	38
6.2	TERMOGRAVIMETRÍA (TGA)	44
6.3	CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)	46
6.4	MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE EMISIÓN DE CAMPO (FESEM) Y MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM)	49
6.5	DENSIDAD Y POROSIDAD	57
7	CONCLUSIONES	59
8	GLOSARIO DE TÉRMINOS	60
9	PLIEGO DE CONDICIONES	61
9.1	PLIEGO DE CONDICIONES GENERALES	61
9.1.1	NORMATIVA	61
9.2	PLIEGO DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS	65
9.2.1	FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS REACTIVOS	65

9.2.2	ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LOS EQUIPOS	92
9.3	PLIEGO DE PRESCRIPCIONES DE GESTIÓN DE RESIDUOS	99
9.3.1	GESTIÓN DE RESIDUOS	99
10	BIBLIOGRAFÍA	102
11	PRESUPUESTO	104

1 AGRADECIMIENTOS

Después de muchos años de carrera, ha llegado el momento de poner punto i final con este Trabajo de Fin de Grado.

Han sido muchos los momentos vividos, la gran mayoría buenos, aunque también quiero acordarme de los malos, porque a veces es de ellos de los que más se aprende.

Me he ido cruzando durante este tiempo con gente muy distinta, algunos de paso, otros para siempre. No obstante, en mayor o en menor medida, todos me han aportado algo y por ello, llegados a este punto, creo que es mi responsabilidad agradecerse.

Quisiera dar las gracias, en primer lugar, a mi tutora en este proyecto, Roser Sabater i Serra, primero por darme la oportunidad de realizar un trabajo tan interesante y segundo por guiarme en todo momento que lo he necesitado. Ha estado siempre disponible y pendiente de que no me faltase nada, cosa que en un proceso como la realización de este proyecto, y además en un centro con el que no estás del todo familiarizado, es siempre de gran ayuda.

También, del Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular, me gustaría agradecer en particular a Laura Teruel toda la ayuda que me ha prestado en el laboratorio, y en general al resto tanto de estudiantes como de profesores del CBIT que me han hecho sentir como en casa desde el primer minuto.

No quisiera olvidarme del profesorado de la ETSID con que he compartido aula, de quien he aprendido todo lo que necesitaba para poder llegar a este momento. A todos ellos, muchas gracias.

A mis compañeros de clase, con quien he pasado los mejores y peores momentos en los estudios, muchas gracias por haber formado parte de mi carrera universitaria, ojalá haya servido yo de ayuda para vosotros como habéis servido vosotros para mí.

Finalmente, y más importantemente, a mi familia, por apoyarme en todo momento, incluso cuando las cosas no salían como hubiese deseado. A ellos, el gracias más grande de todos.

Muchas gracias.

2 OBJETIVOS

El objetivo principal de este proyecto es la fabricación de soportes celulares basados en ácido poliláctico para aplicaciones de ingeniería tisular para la regeneración muscular, y la posterior caracterización de sus propiedades físico-químicas para realizar un análisis cualitativo de la influencia de varios parámetros en el desempeño final del soporte.

Para conseguir el objetivo principal, el presente TFG se ha estructurado en objetivos parciales que, en conjunción, dotan al proyecto de un rango de alcance más amplio:

- Elección de la metodología más adecuada para la preparación de soportes celulares porosos.
- Diseño de un elemento para la fabricación de soportes con porosidades unidireccionales.
- Caracterización morfológica de los soportes a través de las imágenes obtenidas con un microscopio electrónico de emisión de campo.
- Caracterización densiométrica y porosa de los soportes, mediante el principio de Arquímedes.
- Caracterización termográfica del material mediante termogravimetría.
- Caracterización cuantitativa de cristalinidad mediante calorimetría diferencial de barrido.
- Caracterización de propiedades mecánicas mediante ensayos a compresión.

3 MOTIVACIÓN

La gran motivación para la realización de este proyecto ha sido la elaboración del Trabajo de Fin de Grado para la obtención del título de Ingeniero Mecánico otorgado por la Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño.

La elección de la temática vino dada por las ganas de aprender de nuevos campos de la ingeniería con los que poder complementar los conocimientos adquiridos durante la carrera. Así, gracias a esta oportunidad, he podido aplicarme en un nuevo área de trabajo que me permitirá ampliar mis competencias a nivel profesional en un futuro, ya que los temas tratados distan en cierta medida de lo que se presupone que debe conocer un ingeniero mecánico.

Mi interés por este diferente campo de estudio viene motivado por una gran curiosidad respecto al mundo de la biología y la química y la unión de éstas con la ingeniería. La regeneración de tejidos es algo que siempre me ha parecido fascinante, por lo que poder aportar mi granito de arena y aprender de esta nueva técnica era una oportunidad que no podía dejar pasar.

4 INTRODUCCIÓN

4.1 INGENIERÍA TISULAR

El avance constante en el campo de la medicina nos ha permitido curar enfermedades y reparar daños que hacía unos años se creían irreparables. La ingeniería de tejidos es uno de los campos que más ha evolucionado gracias a tecnologías y materiales que se superan a sí mismas constantemente. Ahora somos capaces de reemplazar tejidos humanos dañados con tejidos fabricados en un laboratorio obteniendo un resultado prácticamente igual al original. Esto nos permite evitar muchos de los inconvenientes que se presentaban antes con los implantes de tejidos, como disponibilidad limitada del tejido, la pérdida de gran parte del mismo, dolores en el sitio de extracción, pérdida de cualidades, etc. [1] Para poder hacer todo esto, la ingeniería de tejidos se basa en el uso de biomateriales biodegradables que, junto con otras características bioactivas hacen que se puedan cultivar e implantar los tejidos nuevos con éxito. Por ello, se define a la ingeniería tisular como el área científica interdisciplinaria (Figura 1) en la que científicos de varias áreas (molecular, celular, biológica) trabajan conjuntamente con ingenieros y cuyo fundamento esencial es el uso de células vivas, manipulación del entorno extracelular, creación de sustitutos biológicos y su consecuente implantación en el cuerpo. Con ello se quiere reparar reemplazar, mantener o mejorar la función particular de un órgano o tejido. [2]

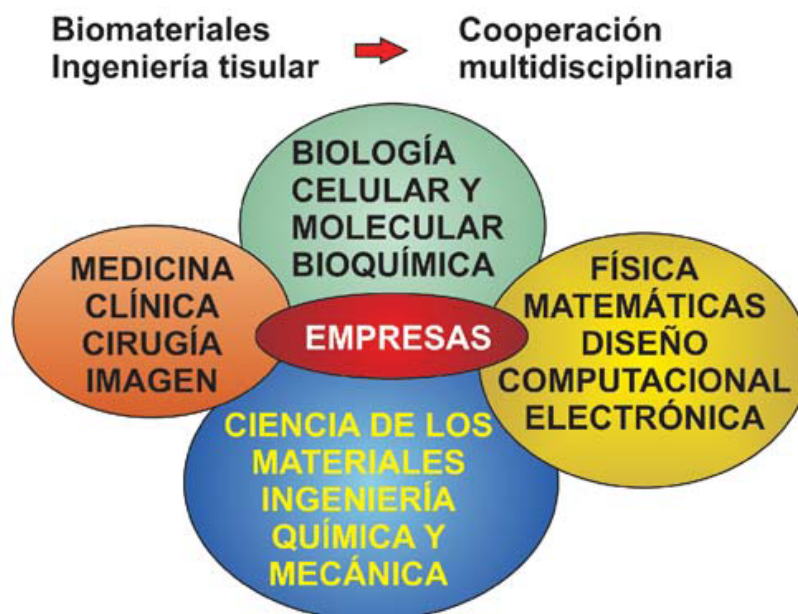


Figura 1 Algunas áreas de conocimiento que intervienen en el proceso de creación de biomateriales para ingeniería tisular

Es por todo esto que se considera que en medicina regenerativa, la ingeniería de tejidos ofrece grandes posibilidades para desarrollar elementos que puedan ser totalmente compatibles con el cuerpo y con su avance se abren muchas puertas para mejorar los tratamientos e incluso curar algunas enfermedades y condiciones como defectos de nacimiento, desórdenes músculo-esqueléticos, el Alzheimer, el Parkinson, la diabetes, lesiones de la médula espinal, enfermedades cardíacas, etc. [3]

Y no únicamente en medicina regenerativa, también en medicina de investigación, el poder recrear órganos y tejidos con un grado de exactitud muy alto permitiría hacer ensayos sobre éstos y obtener resultados óptimos (probablemente incluso mejores que muchos de los que se obtendrían sin los tejidos creados en el laboratorio) sin tanto coste y sin tener que recurrir en muchos casos a la experimentación con animales.

A la hora de desarrollar los nuevos tejidos, la ingeniería tisular emula las condiciones de crecimiento que se darían en condiciones normales. Para ello, las células necesitan crecer alrededor de una matriz extracelular o soporte. Dicha matriz tiene que tener las características adecuadas para un buen desarrollo de las células, evitando respuestas inmunológicas (como inflamación y/o rechazo) y con un diseño que se adecúe a las características necesarias para el desarrollo y diferenciación celular. Es por ello, pues, que la matriz tiene que cumplir con unas características materiales y estructurales específicas para el tipo de tejido que se desee cultivar. [4]

4.2 BIOMATERIALES

Un biomaterial se considera todo aquel producto que se utiliza para imitar el trabajo de los tejidos vivos en un sistema biológico, siendo dicha reproducción de las funciones del tejido segura, mecánicamente funcional y que fisiológicamente aceptable. Los biomateriales pueden ser implantados en el sistema biológico de manera temporal o permanente y son utilizados para mejorar o reparar algún daño o defecto e incluso, en algunos casos, regenerar el tejido que se encontraba en esa zona. [5]

Los biomateriales también se caracterizan por proceder de diversos y muy distintos orígenes. Por ello, se pueden encontrar metales, cerámicas, vidrios, polímeros (sintéticos y naturales), tejidos biológicos que han sido modificados, etc. Como es comprensible, no todos los materiales se utilizan en todo su rango de aplicación, por lo que también existe una gran diversidad de ellos según su funcionalidad.

Para que un biomaterial pueda ser aprobado para su uso, se tiene que cumplir que sea **biocompatible**, que significa que el material tiene que ser aceptado por el receptor, sin producir ningún tipo de mecanismo de rechazo en éste hacia el biomaterial; también tiene que cumplirse que no sea ni cancerígeno ni tóxico para el organismo receptor; así como ser estable químicamente o biodegradable (obviamente, en ningún tipo de producto que sea tóxico), según sea un biomaterial diseñado para que se degrade o permanezca; también las características superficiales, las propiedades mecánicas y la resistencia, el peso y el tiempo que soporta sometido a fatiga, tienen que ser adecuados para la función que va a desempeñar el biomaterial; por último, el diseño de su estructura, sus dimensiones y

la forma que se le confiera deben adaptarse al objetivo que tienen dentro del organismo receptor (Figura 2).

Importante es también, aunque en menor medida, que el biomaterial pueda ser accesible, con un precio no muy elevado y con un proceso de fabricación fácilmente fabricable así como procesable para facilitar una producción a gran escala. [4]

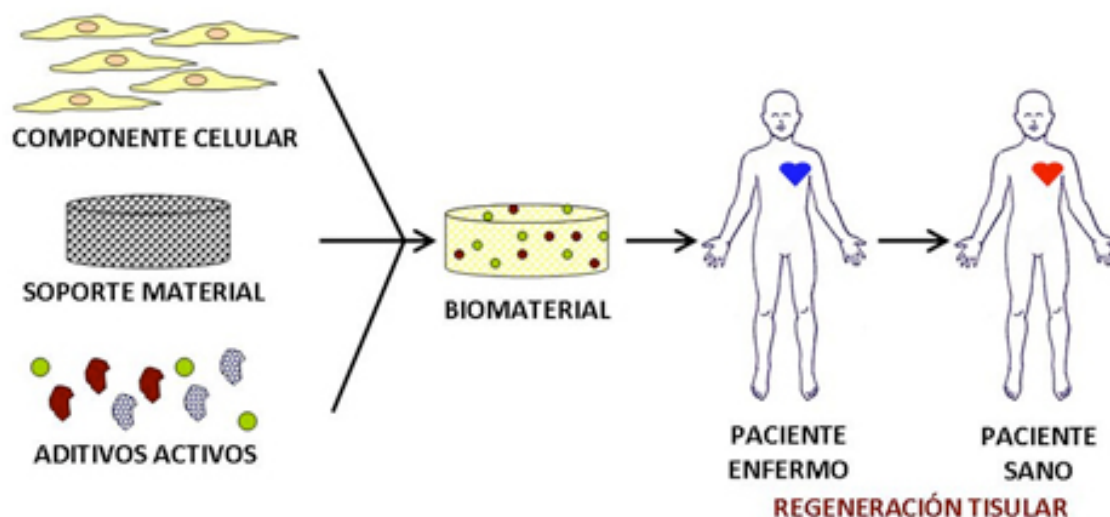


Figura 2 Elementos que componen los biomateriales

4.3 SOPORTES CELULARES POROSOS (*SCAFFOLDS*)

Un *scaffold* (palabra inglesa que en castellano se traduce como andamio) es un soporte poroso utilizado para el cultivo celular en el marco de la ingeniería de tejidos. Para el crecimiento celular óptimo, se necesitan estructuras tridimensionales que sean porosas y que proporcionen un microambiente biomimético para el desarrollo de las células. Los *scaffolds* son utilizados como estructura o matriz extracelular al que se adhieren los elementos biológicos para facilitar su crecimiento. Se les suelen añadir aditivos para mejorar la adhesión y adecuación de las células al andamiaje.

Los *scaffolds* pueden crearse para ensayos *in vitro* o incluso implantarse dentro del organismo en el que se quiere inducir la regeneración del tejido dañado.

Para determinar cómo tienen que ser y cómo se tienen que comportar los andamiajes, tenemos que recurrir a la definición anterior de biomateriales, ya que el *scaffold* es una parte de la tríada que forman los biomateriales (las células, el *scaffold* y los aditivos (moléculas bioactivas o factores de crecimiento)). Por tanto, los *scaffolds* tienen que estar hechos con un material biocompatible, que sea biodegradable, con unas propiedades mecánicas adecuadas para la función que se le va a dar y con una arquitectura del andamiaje eficiente para tanto el uso que de él se requiere como para el ambiente en el que va a trabajar. [6]

4.4 ÁCIDO POLI-L-LÁCTICO COMO BIOMATERIAL PARA SCAFFOLDS

Pese a que se han utilizado muchos tipos de materiales como biomateriales, no todos ofrecen las mismas ventajas. Por ejemplo, pese a que los metales suelen tener unas propiedades mecánicas superiores, su poca biodegradabilidad los limita a la hora de utilizarse como scaffolds. También es el caso de los materiales cerámicos, que son difícilmente procesables para llegar a ser lo suficientemente porosos como para formar eficientes soportes para el crecimiento celular. Los polímeros, sin embargo, ofrecen una alta flexibilidad a la hora de diseñar los *scaffolds*, ya que su composición y estructura se pueden diseñar para adaptarse a los requerimientos específicos que se tengan. También, encontramos polímeros degradables como algunos poliésteres (ácido poliglicólico(PGA), ácido poliláctico (PLA)) y sus copolímeros (ácido poli-L-láctico (PLLA), ácido láctico-co-glicólico, (PLGA)). Estos polímeros son de los pocos sintéticos que han sido aprobados por la FDA (*Food and Drug Administration*; Agencia de Alimentos y Medicamentos) para aplicaciones clínicas en personas.

No obstante, no todo son ventajas con dichos los polímeros y copolímeros, ya que en muchos casos presentan un carácter hidrofóbico, no tienen grupos funcionales (que limitan la adhesión celular, ya que son biológicamente inertes) y poseen una lenta degradación hidrolítica.

El ácido poli-L-láctico, o PLLA, tiene todas las características de los polímeros antes mencionados, por lo que es un polímero altamente atractivo para la creación de soportes celulares, ya que es bioreabsorbible y biocompatible en el cuerpo humano. También tiene una buena resistencia mecánica, procesa bien el calor y es soluble en solventes orgánicos. Se diferencia de la otra molécula quiral, que forma el PDLA, simplemente en la variación de propiedades termodinámicas y mecánicas. [7]

Se trata, en resumen, de un material altamente eficaz en el campo de la ingeniería tisular que ofrece un microambiente adecuado para el cultivo y proliferación de células gracias a todas sus propiedades físicas y químicas. Su uso cada vez es más extendido, gracias a numerosas investigaciones que se están llevando a cabo para probar sus capacidades y que están resultando muy favorables en general.

4.5 LIOFILIZACIÓN

La sintetización de los *scaffolds* se produce mediante varias técnicas, como por ejemplo la extracción en frío, el *electrospinning*, la impresión 3D, la liofilización, etc.

En el caso del PLLA, y para el este proyecto, se quiso experimentar con las técnicas tanto de extracción en frío (conseguida mediante lavados) como de *freeze-drying* (conseguida mediante la separación de fases en la liofilización). Por el tipo de resultados requeridos, la liofilización será la técnica principal de obtención de los andamiajes para este caso.

Se llama liofilización al proceso de secado en frío que se utiliza tanto para conservar materiales biológicos, como para deshidratar alimentos, para obtener ciertas características estructurales con los solutos de algunas disoluciones, y otras muchas aplicaciones más en distintos campos.

La liofilización consiste en desecar un producto que ha sido congelado previamente forzando la sublimación del solvente congelado en condiciones de vacío. Esto se logra al estar en una temperatura inferior a la del punto triple del material a sublimar y bajando después mucho la presión. Se consigue así pasar de estado sólido a gas sin pasar por la fase líquida, como se observa en la Figura 3. El resultado es una masa seca y porosa, que tiene un tamaño similar al que tenía antes de ser liofilizada y menor peso.



Figura 3 Diagrama de fases. La sublimación se consigue a temperaturas inferiores a la del Punto triple, bajando la presión hasta el cambio de fase.

El proceso de liofilización se lleva a cabo en tres etapas principales:

1. **Congelación.** Para obtener una la fase sólida del reactivo que se quiere sublimar, se tiene que congelar primero. Es de destacar el hecho que, por las características del proyecto, se necesita que se produzcan cristales pequeños (obtenidos con una congelación muy rápida), y esto facilita el proceso de liofilización.
2. **Sublimación o desecación primaria.** En esta etapa, casi todo el disolvente pasa a vapor. Se baja la presión hasta el punto en que la fase sólida pase directamente a fase gaseosa. El producto de esta sublimación es después condensado en un condensador que está fuera de la zona de bandejas donde se encuentran las muestras liofilizadas.
3. **Desorción o desecación secundaria.** Cuando ya no queda hielo, se mantiene el liofilizador a la misma presión pero se aumenta la temperatura hasta que esta esté cerca de la temperatura ambiente. Así, se consigue eliminar los últimos restos de vapor, evaporando todo el disolvente no congelado ligado al producto. [8]

4.6 FORMACIÓN DE POROS

La formación de microporos en los *scaffolds* se da en el proceso de congelación del material con el que se quieren formar, contenido en una disolución.

Cuando una disolución es congelada, se forman cristales de solvente, que crecen y desplazan a las moléculas del soluto. Dado que se da el hecho de que las impurezas (el soluto) tienen una solubilidad muy baja en los cristales helados, se obtiene un gradiente de concentración del soluto y se crea un aumento de la concentración justo alrededor del frente de hielo. Este fenómeno se denomina la inestabilidad de *Mullins-Sekerka*, que establece que una estructura de hielo primaria depende de la desestabilización del gradiente de concentración interfacial del soluto y de la energía superficial que se opone a la formación del cristal. La Ecuación 1 permite predecir el espaciado entre los poros, obtenida gracias a un análisis de estabilidad lineal para el ritmo de crecimiento de una perturbación (δ) en la interfaz planar, de magnitud δ como función de la inestabilidad:

$$\frac{\dot{\delta}}{\delta} = \omega^* = \frac{V}{2D} + \left[\left(\frac{V}{2D} \right)^2 + \omega^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Ecuación 1}$$

Donde ω^* es la frecuencia, V es la velocidad de crecimiento y D es el coeficiente de difusión. Para una partícula que se mueve muy cerca del frente de hielo, se produce una fuerza de repulsión entre la fase congelada y la partícula (que por simplificación se considera esférica), que se deriva como se observa en la Ecuación 2:

$$F_{\sigma} = 2\pi R \Delta\sigma \left(\frac{a_0}{d} \right)^n \quad \text{Ecuación 2}$$

donde R es el radio de la partícula, $\Delta\sigma$ es el equilibrio de las fuerzas superficiales en la frontera hielo/solución/partícula, a_0 es la distancia intermolecular media, d es la distancia entre partícula y frente de hielo, n es un parámetro con un valor que varía en un rango de 1 a 4. Nótese que el parámetro $\left(\frac{a_0}{d} \right)^n$ es una corrección de la fuerza de disjunción de la partícula.

La fuerza de arrastre de atracción se deriva para el caso de interfaz plana, como se ve en la Ecuación 3 :

$$F_{\eta} = \frac{6\pi\eta v R^2}{d} \quad \text{Ecuación 3}$$

donde η es la viscosidad de la suspensión del líquido y v es la velocidad de crecimiento del hielo.

El equilibrio de fuerzas resulta en una velocidad crítica de crecimiento de cristales de hielo (Ecuación 4), a la que las partículas, teóricamente, son rechazadas y encapsuladas por el hielo:

$$V_c = \frac{\Delta\sigma d}{3\eta R} \left(\frac{a_0}{d}\right)^n \quad \text{Ecuación 4}$$

A estos datos se le añade que, a una temperatura más baja de congelación, más núcleos de cristalización se crean y por tanto más cristales más pequeños aparecen, que se traduce en poros de menor diámetro medio que para congelaciones a temperaturas más altas. [9]

4.7 DIRECCIONALIDAD DE POROS

El objeto fundamental de este proyecto es obtener *scaffolds*, generando un soporte macroporoso que servirá de matriz extracelular para células musculares.

Los músculos son tejidos blandos que permiten mover ciertas partes del cuerpo con su extensión o contracción. Existen tres tipos de tejidos musculares: el estriado o esquelético, el liso y el cardíaco. Una característica común de estos es la forma en la que se organizan las células para formar los tejidos, creando “filamentos” con varios núcleos celulares, tal y como se puede ver en la Figura 4.

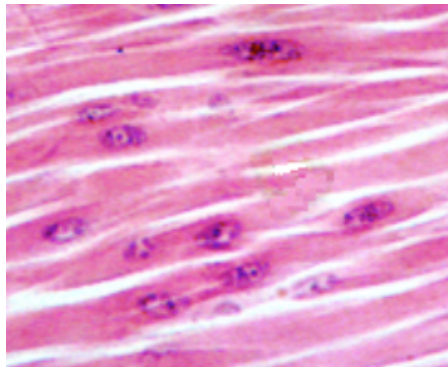


Figura 4 Tejido muscular liso visto en un microscopio

Por esta razón, los poros que se requieren para la regeneración del tejido muscular son poros alineados, de manera y forma que se pueda obtener una base perfecta para la proliferación de tejidos musculares.

Para ello, es importante tanto la velocidad de congelación, como la direccionalidad de la misma y la creación de un gradiente de temperaturas en la dirección deseada de crecimiento de los cristales. También son clave tanto la concentración del polímero en la disolución como la cantidad de agua que se añada a la misma (el agua puede influenciar en la interconectividad de los poros alineados). [10]

5 PREPARACIÓN DE SCAFFOLDS Y TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Los materiales, métodos y técnicas de caracterización empleados se describen a continuación, teniendo en cuenta las características que los hacen adecuados para el objetivo que desempeñan en el proyecto.

5.1 MATERIALES

5.1.1 Nitrógeno líquido

En condiciones normales, se trata de un gas diatómico que forma alrededor de un 78% de la atmósfera terrestre.

Es inodoro e incoloro, y no es tóxico en su estado natural. No obstante, exponerse a altas cantidades de N_2 podría provocar asfixia ya que es un gas inerte y desplaza el oxígeno.


Hay varios métodos de obtención para el nitrógeno, pero industrialmente el más común es destilarlo del aire líquido.

Se utiliza en diferentes campos, ya sea como refrigerante de bajo coste en el campo de la Criogenia, crioconservación de muestras en Ciencias Biológicas, como refrigerante y como agente que cambia las propiedades físicas de los materiales en la industria, etc. [11]

En la aplicación que se le ha dado en este proyecto, el nitrógeno se encontraba en estado líquido, estado que alcanza al estar a igual o menor temperatura que su punto de ebullición, $-195,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ (a 1 atm), lo que ha permitido alcanzar temperaturas de congelación muy bajas, que es óptimo para la rápida formación de cristales en las disoluciones.

A continuación se presentan en la Tabla 1 algunas de sus propiedades de principal interés:

Tabla 1 Propiedades del nitrógeno

Nitrógeno	
N_2	
Temperatura de ebullición (a 1 atm)	$-195,8$
Temperatura de transición vítrea (T_g)	$60 - 65\text{ }^{\circ}\text{C}$
Solubilidad en agua (1 atm; 0°C)	$0,02348\text{ vol/vol}$

5.1.2 Ácido Poli-L-Láctico (PLLA)

En el proyecto, se ha utilizado un PLLA semi-cristalino para los *scaffolds*, disolviéndolo en distintas concentraciones con dioxano.

Inicialmente, para obtener PLLA necesitaremos ácido láctico, que se obtiene mediante la fermentación de recursos renovables como el maíz, la remolacha, el trigo y otros productos con abundancia de almidón. [12] Este polímero ha recibido mucha atención recientemente debido a que es biodegradable y por ello de gran utilidad en aplicaciones médicas.

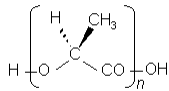
Puesto que el ácido láctico es una molécula quiral, existe en dos formas, PDLA y PLLA. Es conocido que las propiedades del PLA son altamente influenciadas por el ratio estereo-isomérico L/D, tanto térmica como mecánicamente. De hecho, la configuración con el isómero L es metabolizada por el organismo humano, a diferencia de la configuración con el isómero D. Mezclando la composición se obtienen diferentes niveles de cristalinidad y gracias a eso se puede jugar con su biodegradabilidad.[13]

El PLLA, en consecuencia, es el compuesto que obtenemos tras la polimerización del ácido L-láctico. Como ya se ha comentado antes, es un polímero semi-cristalino, con una cristalinidad de alrededor del 37%, termoplástico (similar al polietileno y el polipropileno en algunas de sus propiedades) y totalmente biodegradable. También tiene un elevado módulo de Young (de 2.7 a 16 GPa), por lo que es compatible con aplicaciones en las que se soportan esfuerzos importantes. En cuanto al tiempo que tarda en degradarse, puede estar comprendido entre unas pocas semanas y unos años, según qué tipo de radicales posean sus cadenas y las formulaciones. [14]

Se utiliza en un amplio número de aplicaciones dada su alta versatilidad y las características que ofrece. Así podemos encontrarlo tanto en aplicaciones de ingeniería tisular (como el caso de este proyecto), como en aplicaciones farmacéuticas, prostéticas, en el sector alimentario, etc.

A continuación se presentan en la Tabla 2 algunas de sus propiedades de principal interés:

Tabla 2 Propiedades del PLLA

Ácido Poli-L-Láctico (PLLA)	
$(C_3H_4O_2)_n$	
Temperatura de fusión (a 1 atm)	175 - 178 °C
Densidad atómica	14,0067 g/mol
Soluble en	Cloroformo, Dioxano, Dicloreto, Heptano, DMF, Isopropanol, MIBK, Octanol, THF, Tolueno

5.1.3 Dioxano

El 1,4-dioxano en condiciones normales es un líquido incoloro y volátil que se disuelve fácilmente en agua.

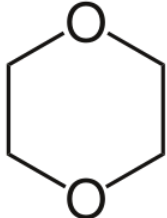
Se puede obtener o por deshidratación inter o intramolecular o respectivamente dehidrocloración de glicol, diglicol o sus productos clorados de sustitución o por dimerización de óxido de etileno. [15]

Sus aplicaciones más frecuentes son como solvente en la fabricación de productos químicos y como reactivo en el laboratorio. Sus propiedades como solvente lo hacen adecuado para otros muchos usos. [16]

En el caso de este proyecto, se ha utilizado como disolvente para el ácido poli-L-láctico, debido a que algunas de sus características, como por ejemplo su temperatura de congelación, eran más adecuadas que las de otros disolventes del PLLA para el uso que se le iba a dar.

A continuación se presentan en la Tabla 3 algunas de sus propiedades de principal interés:

Tabla 3 Propiedades del Dioxano

Dioxano	
$C_4H_8O_2$	
Temperatura de fusión (a 1 atm)	11,8 °C
Peso molecular	88,11 g/mol
Densidad	1,03 g/cm ³

5.1.4 Cloruro de sodio

El cloruro de sodio, o sal común, es un compuesto químico cristalino, inodoro, de sabor salado y muy soluble en agua.

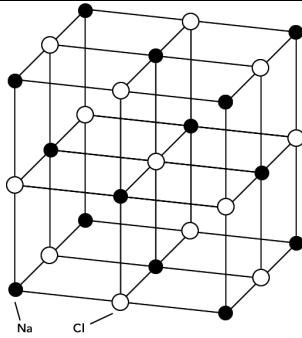
Se obtiene mediante dos procesos principalmente, que son la evaporación de una salmuera y con la pulverización de minerales que lo contengan.

La sal común tiene un amplio espectro de aplicaciones, como puedan ser en el campo de la alimentación, en la fabricación de plásticos, en la producción de hormigón, en productos para piscinas, para el deshielo de carreteras, etc.

En el caso concreto de este proyecto, el cloruro de sodio se ha utilizado para analizar cómo afecta a las condiciones de sintetización del *scaffold* la introducción de una sal, con vista a utilizar los resultados de guía para poder estudiar el comportamiento celular utilizando soportes con liberación controlada de iones bioactivos (a partir de la sal introducida) en el medio de cultivo.

A continuación se presentan en la Tabla 4 algunas de sus propiedades de principal interés:

Tabla 4 Propiedades del cloruro de sodio

Cloruro de sodio	
NaCl	
Densidad	2,16 g/cm ³
Peso molecular	54,4 g/mol
Solubilidad en agua	36,9 g NaCl por 100 mL H ₂ O

5.1.5 Agua

El agua es un compuesto químico inorgánico, inodoro, incompresible, incoloro e insípido que es fundamental para casi todas las funciones de nuestro organismo y además es el componente más abundante del mismo. [17]

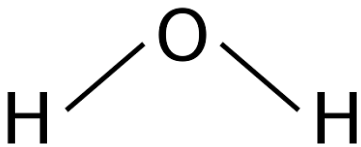
Las moléculas de agua están formadas por dos átomos de hidrógeno y uno de oxígeno que se unen por enlaces covalentes, creando así una molécula altamente estable. Tiene una geometría angular, debido a que el oxígeno es muy electronegativo y atrae hacia sí a los electrones de los enlaces covalentes, creando así una polaridad que hace que se pueda unir con facilidad a otras sustancias polares. Entre moléculas de agua, se crean uniones por puente de hidrógeno, muy importantes para la vida y para otorgar el amplio rango de propiedades físico químicas del agua.

El agua tiene unas importantísimas capacidades como solvente, termorregulador, elemento estructural, etc. Que hacen que sea indispensable en casi todo tipo de medio. En la naturaleza, se puede presentar tanto en estado sólido (hielo o nieve), como líquido (estado al que hace referencia generalmente su nombre) y gaseoso (vapor de agua). [18]

Tiene un alta constante dieléctrica y un calor específico y de vaporización elevados. También cabe notar que permanece en un amplio rango de temperaturas en fase líquida. Para finalizar, es un dato curioso la densidad del agua, ya que es más densa en estado líquido que en estado sólido.

A continuación se presenta en la Tabla 5 algunas de sus propiedades de principal interés:

Tabla 5 Propiedades del agua

Agua	
H ₂ O	
Densidad (líquido) (1 atm)	1 g/cm ³
Peso molecular	18,015 g/mol
Temperatura de fusión	0 °C
Temperatura de ebullición	100 °C

5.1.6 Etanol

El etanol o alcohol etílico es un compuesto químico que en condiciones normales se presenta como un líquido incoloro, volátil y altamente inflamable. Sus vapores son más pesados que el aire. Es soluble en todas proporciones de agua a 20°C.

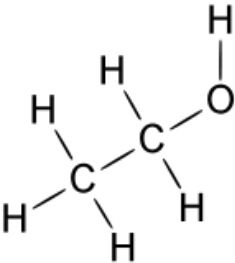
Principalmente, su obtención viene al tratar etileno con ácido sulfúrico concentrado y someterlo a una hidrólisis posteriormente. Cabe notar que también hay métodos naturales de obtención de alcohol, como puede ser la fermentación de levaduras a partir de frutas, cereales, tubérculos, arroz, etc.

Industrialmente, es un producto con un amplio rango de aplicaciones, como por ejemplo la obtención de acetaldehído, vinagre, butadieno, cloruro de etilo y nitrocelulosa, entre otros. También se usa como disolvente en síntesis de fármacos, plásticos, etc. Otros usos son su aplicación para mezclas anticongelantes, algunos

tipos de combustible, como antiséptico, como materia prima en síntesis y en la preservación de muestras fisiológicas y patológicas. [19]

A continuación se presentan en la Tabla 6 algunas de sus propiedades de principal interés:

Tabla 6 Propiedades del etanol

Etanol	
C_2H_6O	
Densidad	0,789 g/cm ³
Peso molecular	18,015 g/mol
Temperatura de fusión	-114 °C
Temperatura de ebullición	78,3 °C
Solubilidad	Soluble en todas las proporciones en agua a 20 °C. Soluble en Cetonas, Esteres, Éteres, Glicoles y otros Alcoholes

5.2 MÉTODOS

5.2.1 PREPARACIÓN DE DISOLUCIONES

Para preparar las disoluciones, se prepararon primero los reactivos que se iban a utilizar: se vertió en un vaso de precipitados mediano una cantidad aproximada a la necesitada de dioxano, y se pesó la cantidad adecuada de PLLA sólido granulado en una balanza digital de precisión. Una vez se tuvieron las cantidades adecuadas de los reactivos, se utilizaron frascos de vidrio con cierre hermético roscado para contener las disoluciones y dejarlas en un agitador magnético entre 12 y 24 horas. Se observó que en altas concentraciones de PLLA, el dioxano no era capaz de disolverlo únicamente con la agitación, por lo que se procedió a llevar a cabo el proceso de agitación a una temperatura de 50 °C para que así se disolviese del todo.

Más adelante, se prepararon también disoluciones de cloruro de sodio en agua (siguiendo el mismo procedimiento que antes) para añadirlas a las disoluciones de dioxano con PLLA. También se prepararon disoluciones dioxano y agua (sin cloruro de sodio) para analizar su influencia sobre la formación de la estructura porosa. En ambos casos se usó un agitador magnético con la muestra a 50 °C para asegurar la homogeneidad de la disolución. Cabe destacar que el agua sola provocaba una reacción de precipitación en el PLLA visible antes de usar el agitador, mientras que el agua salada no provocaba ningún efecto visible a simple vista.

Las disoluciones que se prepararon fueron las siguientes, con la cantidad de cada una empleada detallada en Tabla 7:

- Dioxano + PLLA (3%) (w/w)
- Dioxano + PLLA (5%) (w/w)
- Dioxano + PLLA (7%) (w/w)
- Dioxano + PLLA (10%) (w/w)
- Dioxano + PLLA (15%) (w/w)
- Dioxano + PLLA (7%) + H₂O (2%) (w/w)
- Dioxano + PLLA (7%) + H₂O (5%) (w/w)
- Dioxano + PLLA (7%) + H₂O (10%) (w/w)
- Dioxano + PLLA (7%) + 1·(H₂O + NaCl) (5%) (w/w)
- Dioxano + PLLA (7%) + 5·(H₂O + NaCl) (5%) (w/w)

Tabla 7 Cantidad de reactivos utilizadas para las disoluciones

	DISOLUCIÓN	DIOXANO	PLLA	H ₂ O	NaCl
1	<i>Diox+PLLA 3%</i>	30 g	0,9 g	-	-
2	<i>Diox+PLLA 5%</i>	30 g	1,5 g	-	-
3	<i>Diox+PLLA 7%</i>	30 g	2,1 g	-	-
4	<i>Diox+PLLA 10%</i>	30 g	3 g	-	-
5	<i>Diox+PLLA 15%</i>	30 g	4,5 g	-	-
6	<i>(Diox+PLLA 7%)+ H₂O 2%</i>	4,9 g		0,1 g	-
7	<i>(Diox+PLLA 7%)+ H₂O 5%</i>	4,75 g		0,25 g	-
8	<i>(Diox+PLLA 7%)+ H₂O 10%</i>	4,5 g		0,5 g	-
9	<i>(Diox+PLLA 7%) + (H₂O+1·NaCl)</i>	9,42 g		0,58 g (de disol. con 10 g H ₂ O y 97,6 mg NaCl)	
10	<i>(Diox+PLLA 7%) + (H₂O+5·NaCl)</i>	4,75 g		0,25 g (de disol. con 10 g H ₂ O y 488 mg NaCl)	

Con las diferentes concentraciones y composiciones en las disoluciones se analizó el efecto que se producía tanto en la morfología de los poros como en las propiedades de los *scaffolds*, para así determinar qué disolución sería la más adecuada para la realización de los cultivos celulares *in vitro*.

Con las sales se quiso ver qué efecto tenía sobre los andamiajes añadirlas, ya que se prevé utilizar sales en otras fases del proyecto. En particular, está previsto utilizar sales de cloruro de zinc, con objeto de estudiar el efecto de la liberación de iones de zinc desde los *scaffolds* sobre las células musculares.

5.2.2 OBTENCIÓN DE *SCAFFOLDS*

A la hora de obtener los *scaffolds*, se llevaron a cabo dos procedimientos experimentales diferentes para compararlos entre sí y observar qué tipo de poro se podía obtener con cada una. Posteriormente, el trabajo se centró en la obtención de estructuras porosas alineadas, eligiendo la metodología más eficaz. Al principio, ambos métodos compartían la fase de congelado de las muestras, que se llevaba a cabo vertiendo primero las disoluciones en viales, que eran después introducidos lentamente con unas pinzas en nitrógeno líquido contenido en un recipiente de poliestireno expandido. A partir de este momento, con las muestras congeladas, los

dos procedimientos experimentales divergían a la hora de extraer el disolvente de las muestras. Estos métodos de extracción fueron:

5.2.2.1 Extracción en frío (o Freeze-extraction)

Los viales (destapados) se introdujeron en un recipiente más grande con etanol a -20°C y luego en el congelador a -20°C también. Esto permite que se produzca un proceso de “lavado” de las muestras sin perder su estructura, ya que el dioxano tiene su punto de fusión a $11,8^{\circ}\text{C}$. Dicho proceso de lavado se produce gracias a que el etanol disuelve el dioxano de la muestra, dejando sólo el PLLA, del cual no es disolvente.

Las muestras pasaron por un proceso que duraba 4 lavados, espaciándose éstos 24 horas entre sí, por lo que durante los 4 días siguientes a la introducción de los viales en un baño de etanol a -20°C , se cambió el etanol todos los días.

5.2.2.2 Secado en frío (o Freeze-drying)

Este procedimiento se llevó a cabo en la liofilizadora, que permite, bajando mucho la presión, pasar directamente de estado sólido a gaseoso el dioxano, manteniendo así la estructura en el PLLA.

Para evitar que en el tiempo que se tarda en llevar las muestras del congelador a -80°C hasta la liofilizadora, colocarlas dentro de la misma y obtener la presión adecuada para que no pasase por el punto de fusión del dioxano, las muestras se introdujeron en un recipiente de teflón con nitrógeno líquido. En el caso de los viales, también se vertió nitrógeno líquido en las bandejas de la liofilizadora, que estaban a temperatura ambiente (unos 27°C), para evitar el máximo tiempo posible que se calentasen las muestras. Para los tubos de ensayo que se congelaron más adelante, al ponerlos en las bandejas y por ser demasiado altos, se tuvo que adaptar una manera para que cupiesen y se pudiesen mantener fríos. Se introdujeron en cristalizadores de teflón, dos tubos por cada uno, cubriendo con celofán un trozo de la parte superior del cristalizador para que no cayesen los tubos que en él iban tumbados, como se ve en la Figura 5. Se introdujo nitrógeno líquido dentro de los cristalizadores y se engancharon a las plataformas de la liofilizadora para que no cayesen al introducirlos en la vitrina de vacío.

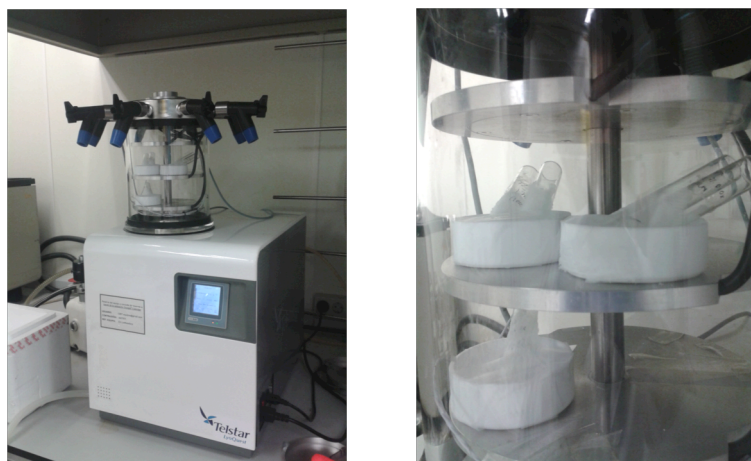


Figura 5 Tubos de ensayo dentro de la liofilizadora. Izq - Imagen de la liofilizadora con las muestras en su interior. Dcha. - Detalle de los tubos de ensayo en los cristalizadores

5.2.2.3 OBTENCIÓN DE SCAFFOLDS CON DIRECCIONALIDAD EN LOS POROS

Este método de obtención de los *scaffolds* se utilizó después de obtener los primeros resultados tanto del *freeze-extraction* como del *freeze-drying*. Sólo se cambió el método de congelación de las muestras, después se introdujeron en la liofilizadora como en el caso de un *freeze-drying* normal.

Para obtener la direccionalidad en los poros, se diseñó un recipiente de poliestireno expandido con tapa que podía sostener un tubo de ensayo en su interior. En dicho tubo de ensayo se vertió una cantidad de disolución suficiente para que tuviese entre 8mm y 2 cm de altura, pudiendo crearse así un gradiente de temperaturas entre la base y la parte mas alta de la disolución.

El recipiente de poliestireno expandido se llenó con nitrógeno líquido hasta unas marcas dibujadas que suponían la base del tubo de ensayo que contenía la disolución. Así, el nitrógeno líquido sólo tocaba la parte más baja del tubo, promoviendo el crecimiento de los poros en la dirección en la que iba el gradiente, o sea, hacia arriba.

También se introdujo una variante en el diseño para propiciar al máximo la congelación unidireccional. Dicha variante consistía en introducir una caja sin tapa, también de poliestireno expandido, más pequeña que la anterior y con un agujero en el centro del diámetro de los tubos de ensayo que se iban a utilizar. En la base de la caja se enganchó una placa de aluminio de 1 mm de grosor. Se eligió el aluminio debido a que había disponibilidad de material y era idóneo gracias a su alto coeficiente de conductividad térmica ($\sim 209,3 \frac{W}{m \cdot K}$). Al introducir el tubo de ensayo en el agujero de la caja, se producía un único punto de contacto entre el aluminio (que posteriormente se enfriaría cuando estuviese tocando el nitrógeno líquido) y la muestra. Con este procedimiento se consiguió además el aislamiento térmico en los laterales del tubo de ensayo. El montaje se puede ver en la Figura 6:

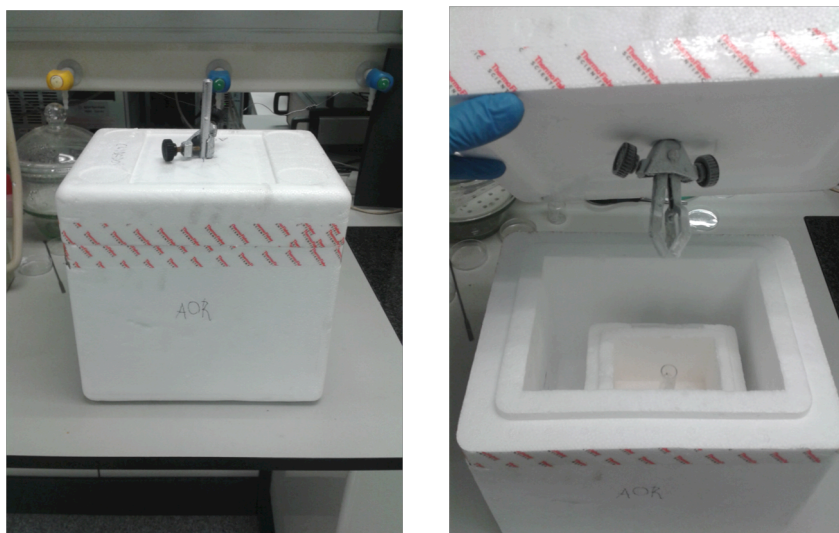


Figura 6 Caja de poliestireno expandido para porosidad direccional. Izq - Caja con la tapa cerrada. Dcha - Caja con la caja más pequeña en su interior sosteniendo una muestra

Se hicieron pruebas con varios tiempos de congelación, entre 20 minutos y 1 hora.

5.3 TÉCNICAS DE CARACTERIZACIÓN

Se utilizaron distintos métodos para determinar las propiedades físicas y químicas de los *scaffolds*. Concretamente, se hicieron cinco tipo de ensayos a las muestras, siendo estos:

- Micro-test de propiedades mecánicas
- Termogravimetría
- Calorimetría diferencial de barrido
- Microscopía
- Densidad

5.3.1 MÁQUINA DE MICRO-ENSAYOS MECÁNICOS

Para caracterizar mecánicamente los *scaffolds*, se optó por someterlos al esfuerzo más característico que se aplicaría sobre ellos cuando fuesen usados como soportes celulares: la compresión.

Para realizar dicha prueba, se requirió el uso de una máquina de ensayos universal. No obstante, no cualquier máquina de test a compresión es válida, ya que con muy poca carga es suficiente para aplastar totalmente los *scaffolds*. Es por ello que se utilizó una máquina de micro-ensayos, preparada para trabajar con muestras pequeñas y a cargas menores que las máquinas de ensayos universales más comunes (**Microtest EM1/50**).

Sin embargo, pese a las diferencias en el tipo de muestras que se ensayan en estos aparatos, sus funcionamiento y características básicas siguen siendo iguales.

Una máquina de ensayos universal es semejante a una prensa, y puede someter materiales a ensayos de distinta naturaleza, como pueden ser compresión, tracción, flexión, etc. Para conseguir la fuerza, utiliza un sistema hidráulico o un motor que hace girar un tornillo que a su vez desplaza unas placas o mandíbulas que son las que finalmente ejercen la fuerza sobre la muestra (Figura 7).

Gracias al control sobre el desplazamiento y la fuerza aplicadas, registra datos sobre deformación que sufre la muestra que se está analizando, con lo que se pueden obtener características físicas de ésta como su elasticidad, ductilidad, etc. [20]



Figura 7 Máquina de micro-ensayos mecánicos

En el caso concreto de éste proyecto, como se ha dicho anteriormente, se buscó caracterizar las muestras a compresión. Para ello, la máquina aplicaba una fuerza de compresión máxima de 500 N, con una velocidad de avance de 0,5 mm/min, sobre el *scaffold*. Con esto, se pretendía observar las diferentes zonas de comportamiento del material, con especial interés en la zona elástica para así poder determinar el módulo de Young medio de las diferentes muestras, con la Ecuación 5:

$$E = \frac{\sigma}{\epsilon}$$

Ecuación 5

donde σ es la tensión y ϵ es la deformación de la muestra.

Para el análisis, se troquelaron las muestras en cilindros de unos 5 mm de diámetro y entre 2 y 3 mm de espesor. Se realizaron 3 ensayos por muestra, en aras de conseguir el valor más representativo haciendo la media, aun sabiendo que estadísticamente se podía encontrar un amplio rango de error, especialmente en muestras que fuesen poco homogéneas.

El ensayo de compresión se realizó con 4 tipos de muestras, para observar cómo influían los parámetros de procesado de los *scaffolds* en el comportamiento del material. Así, se utilizaron los siguientes *scaffolds*:

1. *Scaffold* preparado con una disolución de dioxano + PLLA al 7%, con los **poros alineados aleatoriamente** (congelado sin gradiente de temperatura que propiciase la direccionalidad de poro) (disolución 3).
2. *Scaffold* preparado con una disolución de dioxano + PLLA al 7%, esta vez con los **poros alineados verticalmente** (congelado con gradiente de temperatura en el plano vertical) (disolución 3).
3. *Scaffold* preparado con una disolución de dioxano + PLLA al 7% a la que luego se añadió un **10% de H₂O** (congelado también con direccionalidad de poro) (disolución 8).
4. *Scaffold* preparado con una disolución de dioxano + PLLA al 7% a la que luego se añadió un 5% de una disolución de **H₂O+NaCl** (la que tenía **x5** más cantidad de sal) (disolución 10).

Los resultados obtenidos a partir de los ensayos de compresión pueden observarse en la curva teórica representada en la Figura 8:

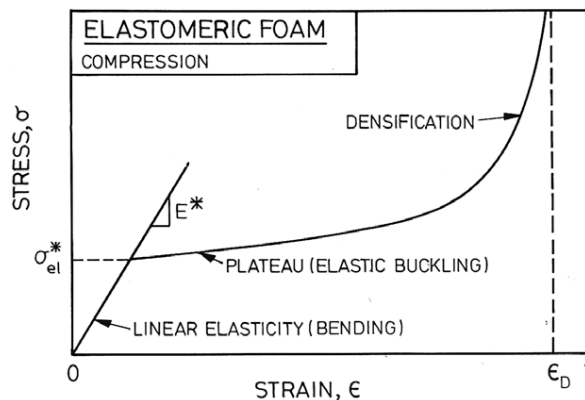


Figura 8 Gráfica característica de tensión-deformación de las muestras a compresión

No obstante, cada material presenta unas características distintas, por lo que no debe de tomarse la gráfica anterior como un modelo a seguir sino como orientación para determinar qué representan las distintas pendientes en según qué lugar de la gráfica de tensión-deformación se esté.

5.3.2 TERMOGRAVIMETRÍA (TGA)

La termogravimetría es una técnica que consiste en medir el peso de una muestra frente al tiempo o a la temperatura mientras se le aplica un programa controlado de temperatura en una atmósfera específica.

Dicho programa puede consistir tanto en mantener la T^a constante (isotermo), como en calentar a velocidad constante, enfriar o alguna combinación de las anteriores. En general, lo que se obtiene es una pérdida de peso debido a la degradación de la muestra (por varios motivos, como descomposición, sublimación, desorción, absorción, etc.), aunque en algunos casos concretos también se puede dar una ganancia de peso. La atmósfera que se utiliza puede ser de dos tipos: estática y dinámica (con un caudal determinado). Los gases más habituales que se utilizan son el N_2 , aire, Ar y CO_2 .

La termogravimetría se diferencia de otros procesos térmicos como el DSC en que es capaz de detectar procesos en los que existe una variación de peso, pero no procesos como fusiones, cambios de fase, etc.

El equipo que se utiliza para el análisis de TGA consta de 5 partes principales (la Figura 9 muestra el equipo que hay en el CBIT (**Mettler Toledo – DSC/TGA 2**)):

1. Microbalanza electrónica (y su correspondiente equipo de control)
2. Horno y sensores de T^a (que suele ser un termopar situado cerca de la muestra)
3. Programador de T^a
4. Controlador de la atmósfera (según el gas y el caudal)
5. Dispositivo para almacenar y en algunos casos procesar los datos de peso y T^a obtenidos de la prueba



Figura 9 Equipo de TGA

También hay que tener en cuenta los pequeños crisoles en los que se introducen las muestras, pues son piezas fundamentales que suelen ser costosas, ya que por mucho que parezcan simples contenedores desechables, los de buena calidad están fabricados con platino (aunque también se utilizan de aluminio o alúmina en algunos casos).

Los resultados del TGA se representan en gráficas denominadas termogramas o curvas termogravimétricas. En ellas se representa el peso en el eje Y (que puede venir dado en valor absoluto o en porcentaje para hacer comparaciones) frente a la temperatura o al tiempo en el eje X. Habitualmente, también se suele solapar en el mismo gráfico la curva correspondiente a la derivada respecto al tiempo o a la temperatura de la curva termogravimétrica (Figura 10). Esta curva representa la velocidad de pérdida o ganancia de peso. Gracias a ella, se pueden vislumbrar con más claridad picos de temperatura, así como la T^a inicial y final de los procesos, al igual que ayuda a detectar procesos solapados. [21]

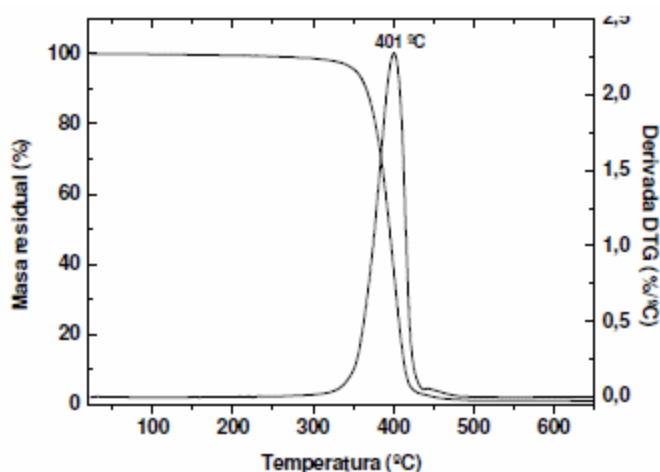


Figura 10 Termograma de un polímero con su derivada

Se pueden obtener diferentes tipos de información de una gráfica como la anterior. Según el momento y la temperatura a la que se produce un cambio en la masa, se pueden establecer ciertos patrones que nos indican qué es lo que ha provocado dicho

cambio. Estas son las razones principales, especialmente para polímeros, en orden de menor a mayor temperatura de aparición:

- Desprendimiento de sustancias volátiles: Cuando hay una pérdida de masa a una temperatura relativamente baja, se suele deber a que se desprenden las sustancias volátiles, agua, monómeros sin reaccionar, productos gaseosos de la descomposición de un material, etc.
- Inicio del proceso de degradación del material polimérico: Se observa la pérdida de masa más grande de todo el proceso, que suele venir dada por la degradación térmica del propio polímero incluso en atmósfera inerte.
- Combustión de la fracción orgánica: El residuo que resulta después de la fase anterior está compuesto por material de naturaleza orgánica que en atmósfera oxidante experimenta un proceso de combustión.
- Presencia de cargas de naturaleza inorgánica. Las cargas de naturaleza inorgánica también quedan como residuos después del proceso de degradación del polímero, dado que, por lo general, resisten a temperaturas más altas.

En el caso del proyecto, el programa que se siguió para el tratamiento de las muestras fue el siguiente:

- Pesado de muestras dentro de la propia máquina, habiendo quemado primero los crisoles que contendrían la muestra con un soplete, para después tarar su peso e introducir las muestras.
- Calentamiento de 30 °C a 700 °C, a una velocidad de 10 °C/min.
- Enfriamiento automático.

Cabe también mencionar que el análisis termogravimétrico de las muestras fue realizado bajo una atmósfera inerte de N₂, con un flujo de aire constante de 50 mL/min.

Se colocaron dos muestras diferentes de la disolución de dioxano + PLLA (7%): Una con un 5% de agua (la disolución 7, usada aquí de control) y otra con agua y cloruro sódico (disolución 9).

5.3.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

A la hora de caracterizar térmicamente los materiales, la técnica de calorimetría diferencial es muy importante, ya que mide la capacidad calorífica molar aparente de macromoléculas o cristales como función de la temperatura. La manipulación subsecuente de esta cantidad proporciona una caracterización termodinámica completa de una transición. Generalmente, hay tres tipos de información que se pueden obtener de un análisis con el DSC:

1. La capacidad calorífica parcial absoluta de una molécula.
2. El conjunto de parámetros termodinámicos (cambio de entalpía [ΔH], cambio de entropía [ΔS], y cambio de capacidad calorífica [ΔC_p]) asociados con una transición inducida de temperatura.
3. La función de partición y concomitantemente la población de estados intermedios y sus parámetros termodinámicos.

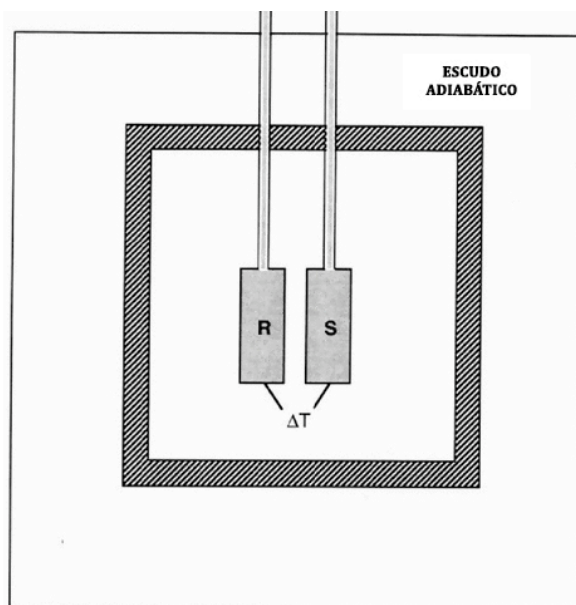


Figura 11 Esquema de un DSC

El funcionamiento del DSC consiste en colocar dos cápsulas al mismo tiempo en dos células distintas (en la Figura 11, una iría en la R y la otra en la S), una de ellas conteniendo la muestra que se quiere analizar y la otra una cápsula de control. La diferencia de temperaturas (ΔT) entre la muestra y el control se mantiene igual a cero mientras la temperatura es aumentada o disminuida a un ratio de escaneo constante gracias a un mecanismo de retroalimentación. La potencia diferencial que tiene que ser aplicada a la célula con la muestra para mantener $\Delta T = 0$ se monitorea continuamente en función de la temperatura. Esta potencia diferencial es directamente proporcional a la capacidad calorífica entre las células y constituye la cantidad básica medida por el aparato. [22]

Una vez obtenidos los resultados, se puede restar el control a la muestra, obteniendo así la representación termográfica característica del material que se quiere analizar. Gracias a la gráfica, se pueden determinar distintos comportamientos en la muestra, según sea su estructura interna y sus características térmicas (Figura 12).

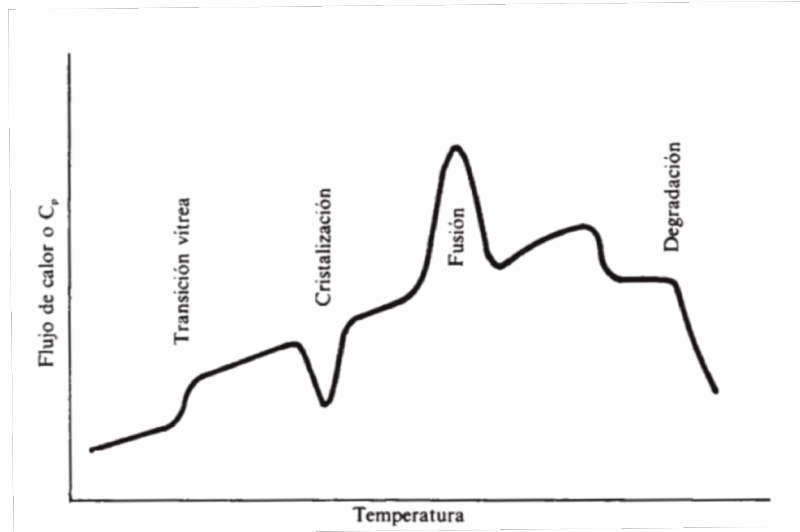


Figura 12 Transiciones térmicas típicas mostradas en un análisis del DSC

Para cada material y/o análisis se preconfiguran unas condiciones para la prueba, de manera y forma que se pueden controlar las condiciones en las que se degradan las muestras.

En el caso del proyecto que aquí se detalla, se utilizó un **Perkin Elmer – DSC 8000** para las pruebas, configurándolo para realizar un único ciclo de calentamiento, sin registrar el enfriamiento. El programa para dicho ciclo era:

1. Primeramente, enfriar de T^a ambiente a 0°C a $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$.
2. Esperar 5 min a 0°C para que se estabilice la temperatura.
3. Calentar de 0°C a 200°C a $20^{\circ}\text{C}/\text{min}$
4. Dejar que se enfríe solo.

En total un ciclo completo tardaba alrededor de 20 min en completarse.

Se hizo la prueba con 7 muestras diferentes de PLLA, todas provenientes de *freeze-drying* con dioxano menos el PLLA puro:

- PLLA 3% (disolución 1)
- PLLA 5% (disolución 2)
- PLLA 7% (disolución 3)
- PLLA 10% (disolución 4)
- PLLA + NaCl (x1) (disolución 9)
- PLLA + NaCl (x5) (disolución 10)
- PLLA puro

Las muestras tenían que tener un peso comprendido entre 2 mg y 8 mg. Una vez introducidas y selladas dentro de las cápsulas para introducir las en el DSC, se les hacía un pequeño agujero con una aguja para así evitar que si habían absorbido agua explotasen con la presión del vapor al evaporarse ésta.

5.3.4 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM)

Como se requería un microscopio mucho más potente que una lupa binocular que permitiera obtener imágenes de alta resolución y con mucha calidad en los detalles para poder analizar las porosidades de las muestras, se necesitaron los microscopios electrónicos que se encontraban disponibles, previa reserva, en el Servicio de Microscopía Electrónica que posee la UPV.

Uno de estos microscopios utilizados fue el SEM (**Jeol JSM 6300**), aunque la opción más explotada fue el FESEM, cuyos detalles se explican en el siguiente apartado.

El SEM es un microscopio electrónico de barrido cuyo fundamento radica en que los electrones emitidos por un cátodo de tungsteno pasan a través de una columna en la que se ha hecho vacío (alrededor de $1,3 \cdot 10^{-6}$ Pa). En esta columna, se focaliza el haz de electrones mediante una serie de lentes electromagnéticas (condensadores), obteniendo así un diámetro de hasta unos 10 nm, que es casi puntual. También se disminuye la intensidad de corriente para que haya una cantidad menor de electrones primarios (son los electrones secundarios los que capta el microscopio).

El haz reducido de electrones se desplaza por toda la superficie de la muestra, como un escáner que barre la muestra continuamente de arriba abajo. En la Figura 13 se puede observar un esquema de cómo se trata el haz de electrones antes de llegar a la muestra. Las muestras, para poder ser analizadas bien con este sistema, tienen que ser conductoras, por lo que se les suele aplicar una capa de algún material (oro, carbono, platino) antes de introducirlas.

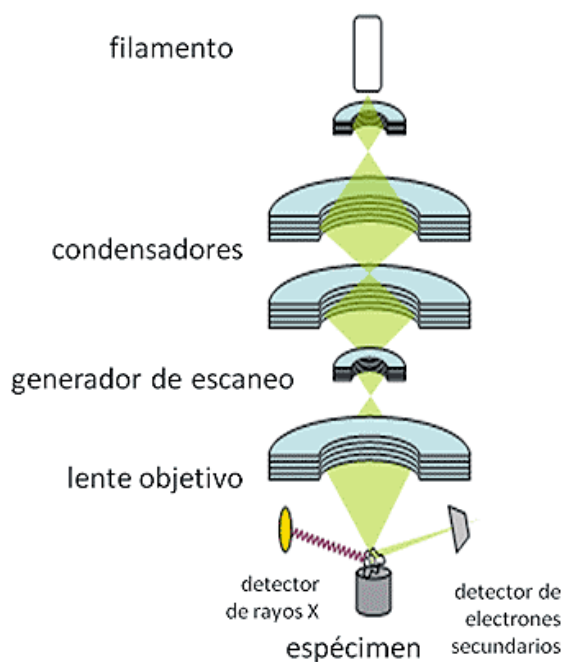


Figura 13 Esquema de un microscopio electrónico de barrido

Cuando el haz se encuentra con la superficie de la muestra que se está observando, se generan electrones secundarios que, después de ser captados por un detector, son hechos incidir sobre un “centelleador” (material que *centellea*, o sea, exhibe luminiscencia cuando por él pasa radiación ionizante) donde cada electrón dará origen a varios fotones. Con estos fotones, gracias a un fotomultiplicador, se generarán fotoelectrones, que a su vez, gracias en este caso a unos dinodos con diferencias de potencial crecientes, generaran un efecto en cascada que producirá una gran cantidad de electrones secundarios. Así, se ha obtenido una amplificación de la corriente que producían los primeros electrones secundarios, obteniendo así la información que se podía extraer de ellos amplificada también.

Los electrones, después de pasar por un videoamplificador, se envían finalmente a una especie de tubo parecido a un osciloscopio de rayos catódicos (que como se sabe, presentan los valores de las señales eléctricas en forma de coordenadas en una pantalla) y producen la imagen de lo que está analizando el microscopio. [23]

En el caso concreto del proyecto, como se ha dicho antes, se utilizó este método de microscopía electrónica como método secundario. El equipo era más antiguo y la resolución no era tan buena como en otras opciones, era más lento y no ofrecía los buenos resultados que se podían obtener con otros métodos. No obstante, el precio por hora era mucho más reducido, así que para algunas pruebas se consideró adecuado el uso del SEM por encima del FESEM.

En el proyecto, se acudió una vez al SEM, y fue cuando se quisieron observar los resultados de la prueba de congelación con gradiente de temperaturas y las diferencias que provocaban en ella determinados parámetros que influían en el procedimiento de congelación, como el tiempo o el método. Quede constancia también de que el voltaje de análisis utilizado en el microscopio cuando se observaron las muestras fueron 15 kV. El equipo que se encuentra en el Servicio de Microscopía Electrónica de la UPV es el que se puede observar en la Figura 14.



Figura 14 Equipo SEM del Servicio de Microscopía Electrónica de la UPV

5.3.5 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE EMISIÓN DE CAMPO (FESEM)

Como se querían resultados mejores que en el SEM para una mejor caracterización morfológica de las muestras, el FESEM se eligió como opción más adecuada. Se realizaron por ello varias sesiones de análisis de las muestras bajo un potente microscopio electrónico de emisión de campo, concretamente el **Carl Zeiss – ULTRA 55**.

Este tipo de microscopio se diferencia del SEM en que no utiliza un filamento calentado para generar los electrones. Las desventajas principales de los emisores termiónicos como los del SEM son que tienen un brillo relativamente bajo, el material del cátodo se evapora y hay una deriva térmica durante la operación.

En el caso del FESEM, se utiliza la emisión de campo, también denominada emisión de campo en frío, que se consigue posicionando el filamento en un gradiente de potencial eléctrico muy grande. El filamento en este caso suele ser de tungsteno, con una forma que le confiere una punta afilada. Con dicha punta, cuyo radio suele estar alrededor de los 100 nm, se puede concentrar un campo eléctrico a niveles extremos, tanto que la función de trabajo del material (la energía mínima necesaria para arrancar un electrón de un sólido a un punto inmediatamente fuera de la superficie del sólido) es rebajada hasta que los electrones pueden dejar el cátodo. Con esto, la imagen producida por el FESEM es más limpia, se consiguen muchas menos distorsiones electrostáticas y la resolución espacial se mejora respecto a la del SEM (<2nm, entre 3 y 6 veces mejor que en el SEM). [24]

El FESEM también es más seguro para las muestras, dado que puede trabajar a menores voltajes que el SEM y se evita así el daño que puede producir, especialmente en muestras delicadas. En la Figura 15 se puede ver el microscopio FESEM que se utilizó en el proyecto.



Figura 15 Equipo FESEM del Servicio de Microscopía Electrónica de la UPV

Las muestras se preparaban como en el SEM: se pegaban con cinta adhesiva de carbono a un portamuestras adecuado para introducir en el microscopio, se creaba

un puente de carbono entre las muestras y el porta, para asegurar una buena transmisión de la corriente eléctrica, y luego el operario que se encontraba en microscopía procedía a aplicarles un baño atomizando un material conductor (en el caso del FESEM, siempre se utilizó platino, por permitir una mejor resolución que el oro) sobre la muestra.

Fueron tres las visitas al FESEM para poder caracterizar las muestras, ya que en al principio, cuando sólo se disponía de la información obtenida a través de la bibliografía, lo adecuados o no que pudiesen ser los resultados que se estaban obteniendo se decidía después del análisis de las imágenes de microscopía:

- La primera visita sirvió para evaluar las diferencias entre *freeze-drying* y *freeze-extraction*, observándose detenidamente varias partes de las muestras para obtener una idea total de la morfología de los *scaffolds*. Esta sesión fue la más larga de todas, ya que había muchas muestras y muchas zonas que analizar.
- La segunda se hizo únicamente para la técnica de *freeze-drying* (que en este caso había sido mejorada gracias a la experiencia anterior) y se centró en la observación de las secciones de los *scaffolds*.
- La tercera y última (posterior a la sesión del SEM) sirvió para analizar las muestras a las que se había añadido agua (disoluciones 6, 7 y 8) y agua con sal (disoluciones 9 y 10).

5.3.6 DENSIDAD Y POROSIDAD

La densidad de un material es la masa por unidad de volumen que ocupa. Son unidades habituales el g/cm³, kg/m³, etc. No obstante, los materiales porosos no rellenan todo el espacio, ya que los poros suelen encontrarse rellenos de gas o de líquido, cosa que dificulta la determinación del volumen y de la masa reales a la hora de medir la densidad.

La porosidad es una medida de espacios vacíos en un material y se expresa como una fracción del volumen de huecos sobre el volumen total, entre 0 y 1, o como un porcentaje entre 0 y 100.

La caracterización por densidad y porosidad fue la más sencilla de todas las que se llevaron a cabo en cuanto a material necesitado. Consistía, simplemente, en hacer mediciones del peso de una muestra en determinadas condiciones (con una balanza **Mettler Toledo – AX205DeltaRange**) para luego calcular la densidad y a partir de ahí obtener la porosidad. Estas mediciones fueron:

- Pesado del *scaffold* en condiciones normales (pesado en aire).
- Pesado del scaffold después de forzar la entrada de líquido dentro de sus poros haciendo vacío con una jeringuilla (pesado en aire con poros saturados de líquido).

- Pesado del *scaffold* dentro de un vaso de precipitados con n-octano, con el montaje experimental de medida de densidades de la balanza electrónica de precisión (pesado sumergido), tal y como se ve en la Figura 16:



Figura 16 Montaje experimental para medida de densidades en la balanza de precisión

Esta prueba se basa en el principio de Arquímedes, que afirma que todo cuerpo sumergido en un fluido experimenta un empuje vertical igual al peso de fluido desalojado.

Como son muestras porosas, la justificación del procedimiento viene dada en los cálculos. Así, se necesitaba rellenar los *scaffolds* con el n-octano para poder hacer el ensayo de densidad como si de un bloque se tratase. Se necesitó así definir el concepto de volumen de la muestra, que es la sustracción del volumen de los poros al volumen aparente, tal y como se ve en la Ecuación 6:

$$V = V_{ap} - V_{poros} = \frac{m_m}{\rho_m} \quad \text{Ecuación 6}$$

donde V es el volumen de la muestra V_{ap} , es su volumen aparente, V_{poros} es el volumen de los poros, ρ_m es la densidad de la muestra y m_m es la masa de la muestra, pesada en condiciones normales (en el aire). De aquí se puede deducir, pues, que el volumen aparente es el volumen del polímero sin tener en cuenta los poros.

Para calcular el volumen de los poros, entraba en juego el forzar un líquido de densidad conocida en su interior, para poder aplicar la siguiente Ecuación 7:

$$V_{poros} = \frac{m_{lp}}{\rho_l} = \frac{m_{ml} - m_m}{\rho_l} \quad \text{Ecuación 7}$$

donde ρ_l es la densidad del líquido (en este caso, n-octano), m_{lp} la masa de líquido alojada en los poros y m_{ml} la masa de la muestra tras inyectar el líquido en los poros.

Es ahora donde entra en juego el principio de Arquímedes, ya que vemos en la Ecuación 8 que el empuje (E) generado por un líquido (en este caso n-octano) es:

$$E = m_{lp} \cdot g = (m_{ml} - m_l) \cdot g = V_{ap} \cdot \rho_l \cdot g \quad \text{Ecuación 8}$$

donde g es la aceleración de la gravedad y m_l es la masa de la muestra sumergida en el líquido (n-octano). Gracias a esto, podemos aislar el V_{ap} resultando en la Ecuación 9:

$$V_{ap} = \frac{(m_{ml} - m_l) \cdot g}{\rho_l \cdot g} = \frac{m_{ml} - m_l}{\rho_l} \quad \text{Ecuación 9}$$

por tanto, la densidad de la muestra porosa (ρ_m) se obtendría como se aprecia ambas Ecuación 10 y Ecuación 11:

$$\frac{m_m}{\rho_m} = V = V_{ap} - V_{poros} = \frac{m_{ml} - m_l}{\rho_l} - \frac{m_{ml} - m_m}{\rho_l} = \frac{m_m - m_l}{\rho_l} \quad \text{Ecuación 10}$$

$$\rho_m = \frac{m_m}{m_m - m_l} \cdot \rho_l \quad \text{Ecuación 11}$$

A partir de este resultado, se puede pasar al cálculo de porosidad (π), que se obtendría con la Ecuación 12:

$$\pi = \frac{V_{poros}}{V_{ap}} = \frac{m_{ml} - m_m}{m_{ml} - m_l} = 1 - \frac{V}{V_{ap}} = 1 - \frac{m_m}{V_{ap} \cdot \rho_m} \quad \text{Ecuación 12}$$

Con estos cálculos se justifica, pues, el procedimiento experimental por cada muestra que se detalla a continuación:

1. Se corta la muestra que va a ser analizada a un tamaño adecuado.
2. Se hace un pesado normal (en aire) del *scaffold*.
3. Se coloca en el interior de una jeringuilla que contiene n-octano. Se hace varias veces “vacío” (taponando la jeringuilla y retirando el émbolo el máximo posible), hasta que se haya forzado en la medida de lo posible la entrada del n-octano en la muestra.
4. Se pesa la muestra que tiene los poros llenos de n-octano en la balanza normal (en aire).
5. Se introduce la muestra en un montaje preparado sobre la balanza para medir densidades (un montaje que permite el efecto del empuje del líquido sobre la muestra mientras está sumergida) y se pesa.
6. Se hacen los cálculos pertinentes.

Se utilizaron 8 muestras diferentes, de las cuales 4 eran con poros aleatorios y 4 con poros alineados. De las 4 aleatorias, había una de cada concentración que se había hecho, es decir, 3%, 5%, 7% y 10% (disoluciones 1, 2, 3, 4). De las alineadas, todas estaban hechas con la concentración 7%: dos tenían como diferencia que una había sido congelada con contacto directo con el nitrógeno líquido y la otra con contacto con la placa de aluminio, y las otras dos tenían agua en la disolución (5% y 10%).

6 ANÁLISIS DE RESULTADOS

A continuación se mostrarán todos los resultados obtenidos de los análisis realizados a los distintos *scaffolds* sintetizados a partir de PLLA con dioxano, en sus diferentes concentraciones y con diferentes métodos de producción de andamiajes.

Cabe destacar que al principio del proyecto se planteó usar como disolvente del PLLA cloroformo (CHCl_3), así como diferentes temperaturas para hacer la congelación, pero dado que en el primer caso el cloroformo tenía la temperatura de fusión demasiado baja ($-64\text{ }^{\circ}\text{C}$) y suponía un riesgo demasiado grande de descongelación durante la manipulación de los viales con el reactivo congelado, y en el segundo caso se sabía que por cristalización, cuanto más veloz fuese la congelación, mayor cantidad de microporos se obtendrían, por ahorro de materiales y tiempo, se decantó por la utilización de dioxano como solvente, ya que presenta una temperatura de fusión más elevada que el cloroformo y por congelar las disoluciones a la mínima temperatura posible ($-196\text{ }^{\circ}\text{C}$ conseguidos con el nitrógeno líquido).

6.1 MÁQUINA DE MICRO-ENSAYOS MECÁNICOS

La máquina de micro-ensayos mecánicos ha servido para analizar el comportamiento de los *scaffolds* al ser sometidos a un esfuerzo de compresión.

Primeramente, se representaron las gráficas de tensión deformación de las muestras por separado, con las tres pruebas por muestra. Las representaciones quedaron bastante irregulares debido a la poca precisión de la máquina, especialmente cuando la fuerza era mayor. No obstante, como se buscaba el módulo elástico, se dieron por válidas las medidas. Para representarlas, se tomaron las zonas elásticas y se hicieron rectas con una pendiente igual al módulo de Young, en un intervalo de deformación de entre 0,1 y 0,5.

Poros aleatorios

En las Figuras 17-18 se pueden apreciar las gráficas para los *scaffolds* obtenidos con una disolución de dioxano + PLLA (7%) con los poros ordenados **aleatoriamente**.

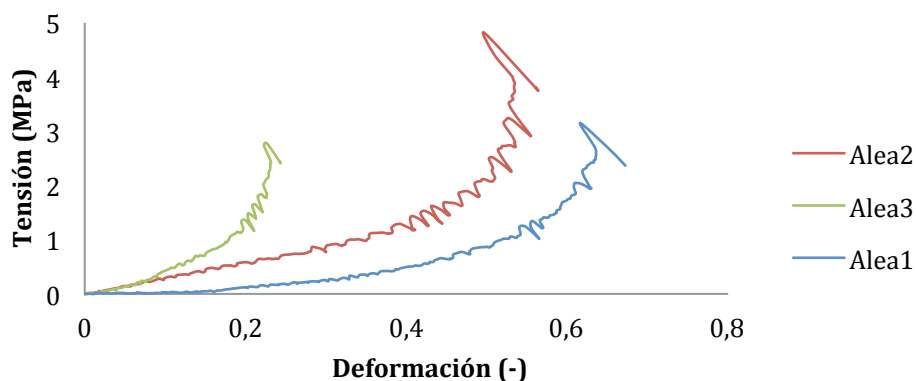


Figura 17 Gráfica tensión-deformación de *scaffold* con los poros aleatorios

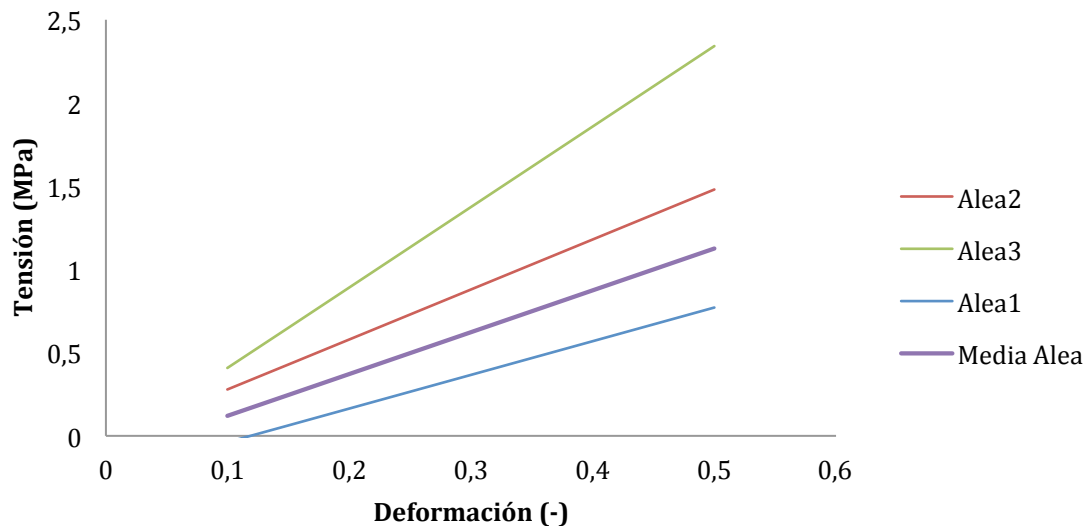


Figura 18 Zona elástica de la gráfica de tensión-deformación de un *scaffold* con los poros aleatorios

Como se puede apreciar, la gran diferencia entre las pendientes de la zona elástica de la tercera muestra respecto a las otras dos hizo que se descartase esa medida. Se aprecia también que pese a no ser muy exactas las medidas, las pendientes de la primera y la segunda muestra son similares.

Las grandes variaciones entre los valores de estas medidas se deben principalmente a las diferencias entre las estructuras que puedes encontrar en según qué zona del *scaffold*, ya que los poros pueden estar bien alineados en un lado, en otro ser completamente aleatorios, en otro una mezcla de ambas, etc. Lo que le confiere mucha heterogeneidad y por ello poca fiabilidad a la hora de determinar un valor concreto del módulo de Young para toda la estructura.

Poros direccionales

En las Figuras 19-20 se pueden apreciar las gráficas para los *scaffolds* obtenidos con una disolución de dioxano + PLLA (7%) con los poros ordenados **direccionalmente**.

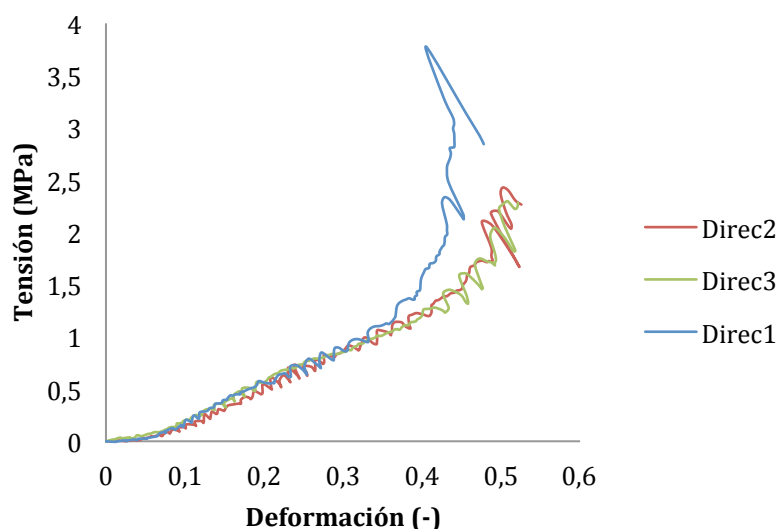


Figura 19 Gráfica tensión-deformación de *scaffold* con los poros direccionales

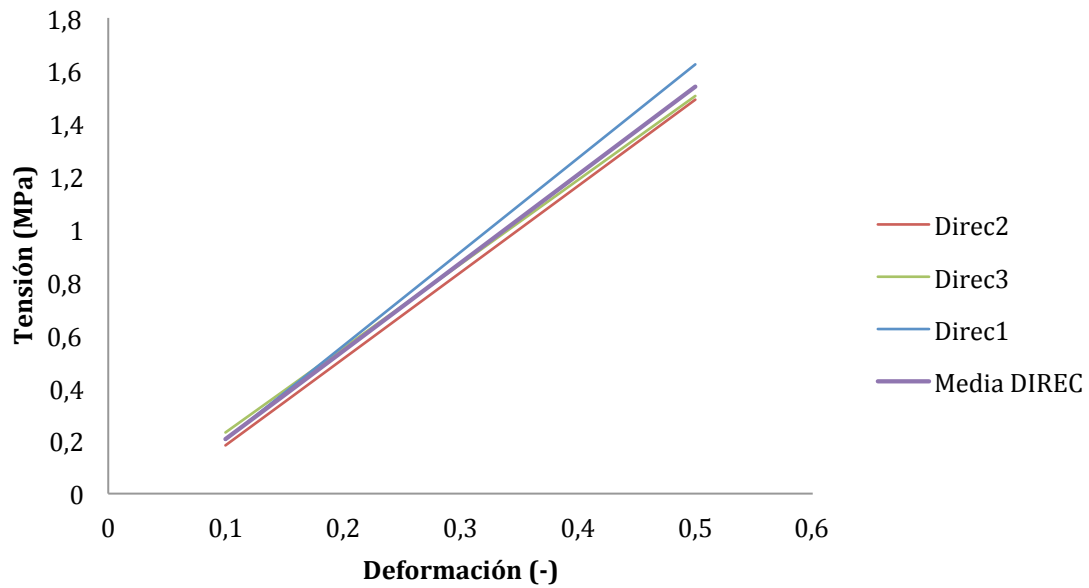


Figura 20 Zona elástica de la gráfica de tensión-deformación de un *scaffold* con los poros direccionales

Para este caso sí que se observa una mayor homogeneidad de resultados. Esto es debido a que el *scaffold* presenta una estructura muy parecida en casi todo su volumen, por lo que se beneficia de la estructura con los canales verticales en todo el soporte, confiriéndole una buena resistencia en cualquier punto.

Disolución con agua

En las Figuras 21-22 se pueden apreciar las gráficas para los *scaffolds* obtenidos con una disolución de dioxano + PLLA (7%) + **H₂O (10%)** con los poros ordenados direccionalmente.

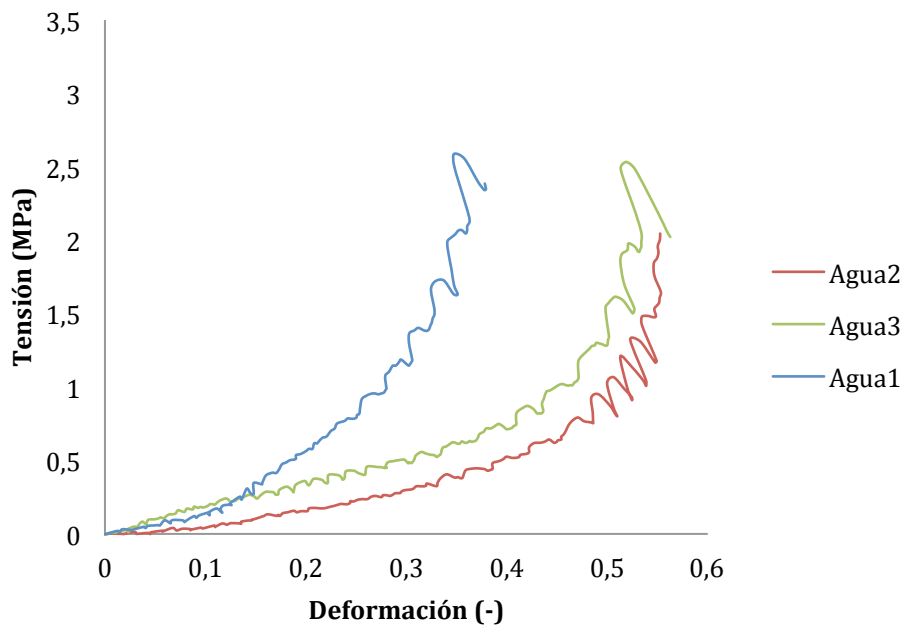


Figura 21 Gráfica tensión-deformación de *scaffold* con agua (10%) en la disolución

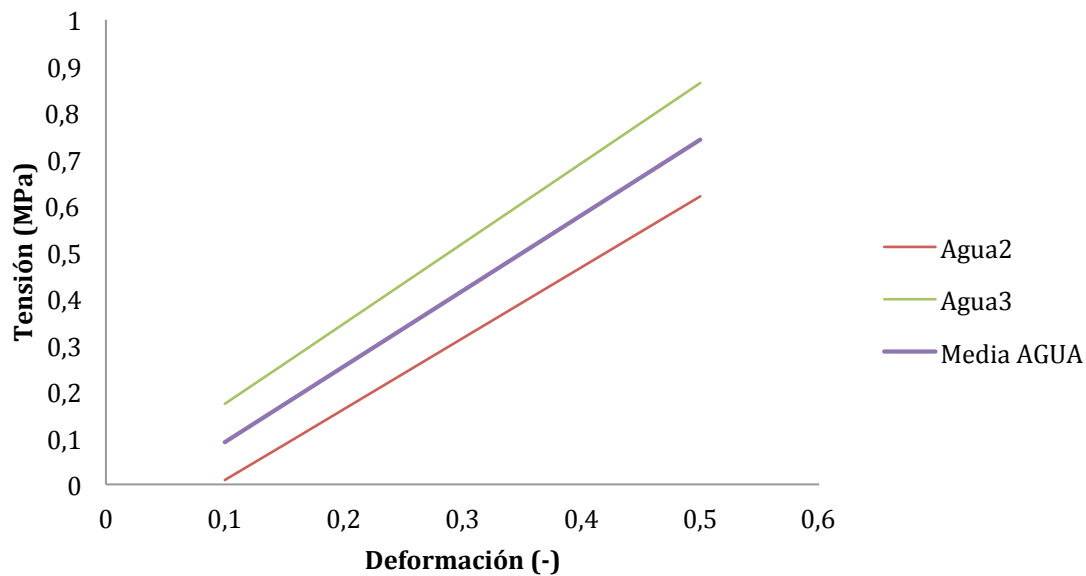


Figura 22 Zona elástica de la gráfica de tensión-deformación de un *scaffold* agua en la disolución

Se aprecia de nuevo una gran dispersión en los resultados, tanto que la primera muestra no ha sido incluida en la gráfica de la zona elástica porque se salía totalmente del rango de representación.

La gran heterogeneidad de estas muestras nos indica que el agua tiene un efecto parecido a los poros aleatorios, haciendo que las muestras vean una disminución en sus propiedades mecánicas, así como una incertidumbre en la respuesta a los esfuerzos mecánicos de según qué zona.

Disolución con agua + sal

En las Figuras 23-24 se pueden apreciar las gráficas para los *scaffolds* obtenidos con una disolución de dioxano + PLLA (7%) + ($\text{H}_2\text{O}+5\cdot\text{NaCl}$) (5%) con los poros ordenados direccionalmente.

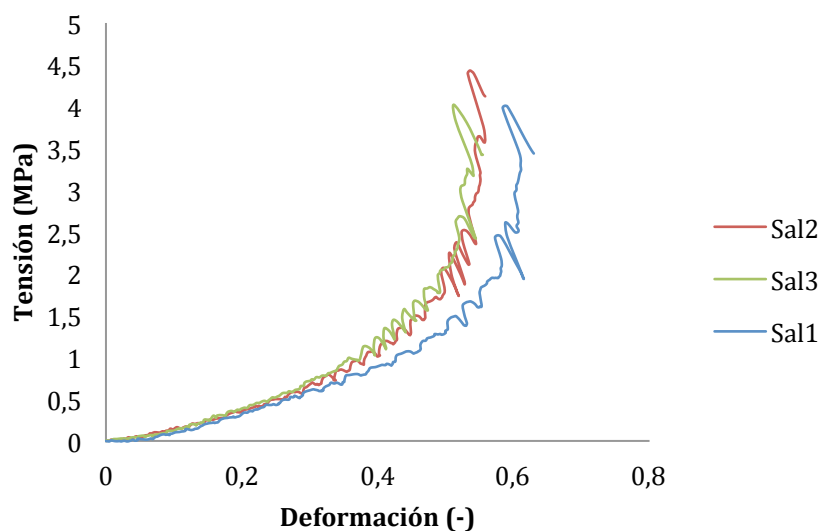


Figura 23 Gráfica tensión-deformación de *scaffold* con agua con sal (5%) en la disolución

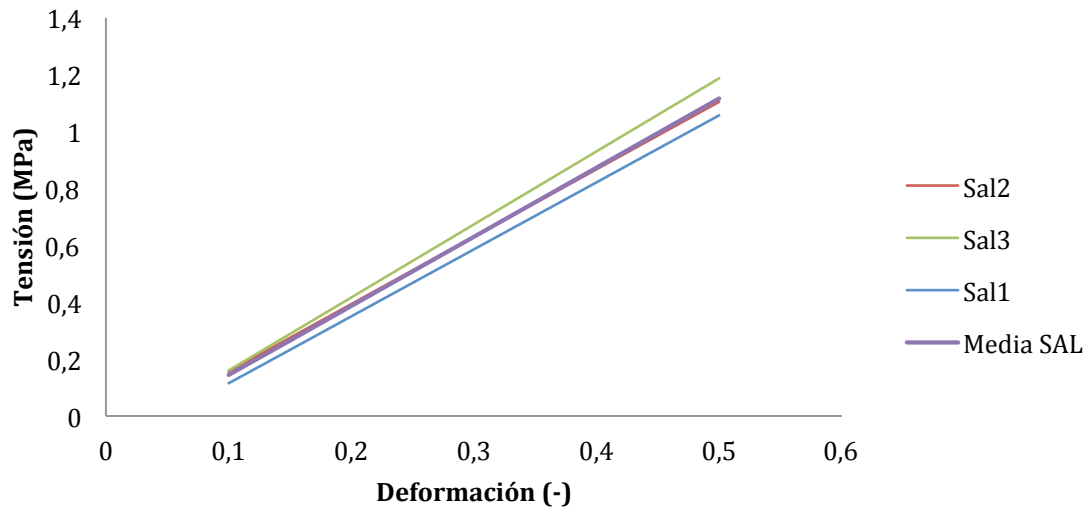


Figura 24 Zona elástica de la gráfica de tensión-deformación de un *scaffold* agua en la disolución

Se aprecia en estas muestras que, al haber menor cantidad de agua en la disolución y el proceso de congelado ser el mismo que para el poro direccional, vuelve a haber una mayor homogeneidad de resultados. La sal no parece afectar de manera significativa, cosa que es lógica dada su pequeñísima concentración.

Representación conjunta de las zonas elásticas

A continuación, en la Figura 25, se representarán todas las medias de las zonas elásticas representadas más arriba en una misma gráfica para poder compararlas.

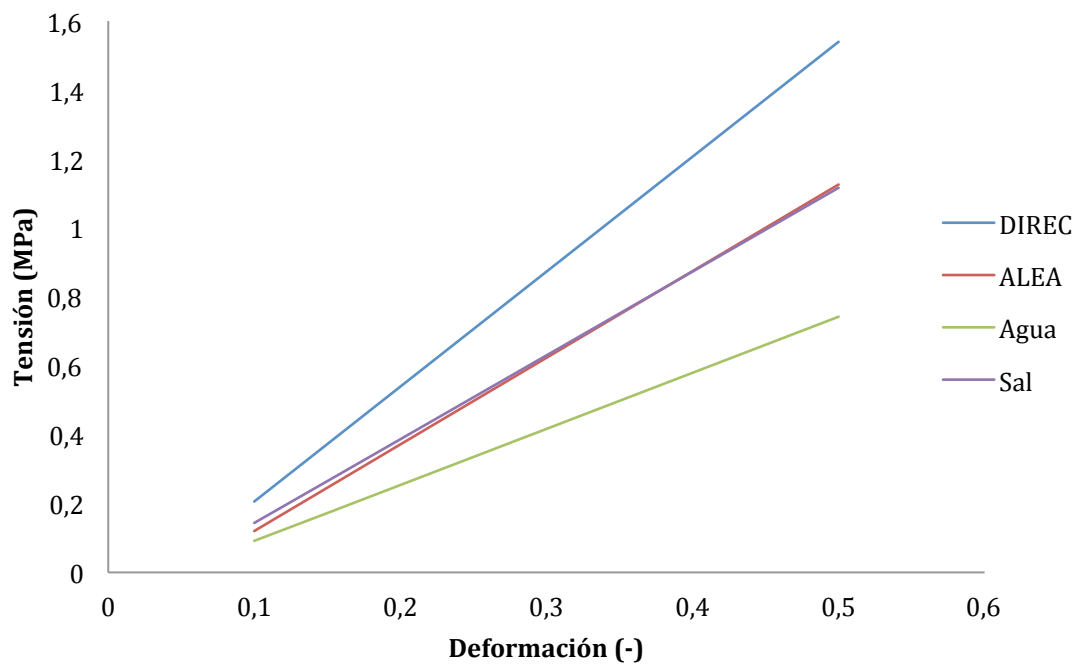


Figura 25 Zonas elásticas de la gráficas de tensión-deformación de todas las muestras

Se aprecia claramente lo que se podía intuir con los resultados individuales. La muestra que más resistencia tiene es la de poros direccionales. La de poros aleatorios

está exactamente al mismo nivel que la que contiene sal, que habíamos visto que probablemente la sal no tuviese efecto en este resultado, por lo que significa que un 5% de agua en una muestra de poro direccional equivale más o menos a una muestra sin poro direccional. Por último, la muestra que fue sintetizada con un 10% de agua queda con la menor resistencia mecánica a compresión.

Módulo de Young

Para contrastar estos datos y ofrecer valores de propiedades mecánicas concretos, se calculó el módulo de Young (módulo aparente) de todas las muestras.

En la Tabla 8 podemos ver los valores del módulo de Young para cada una de las muestras, con su desviación estándar correspondiente. En la Figura 26 , se han representado los módulos de Young como puntos con la desviación típica como barras de error para un resultado más visual.

Tabla 8 Módulos de Young

MUESTRA	M. DE YOUNG (MPa)	DEV. ESTÁNDAR
Poros aleatorio	2,51	0,69
Poros direccional	3,34	0,19
Disolución 10% agua	1,63	0,14
Disolución 5% agua + sal	2,43	0,11

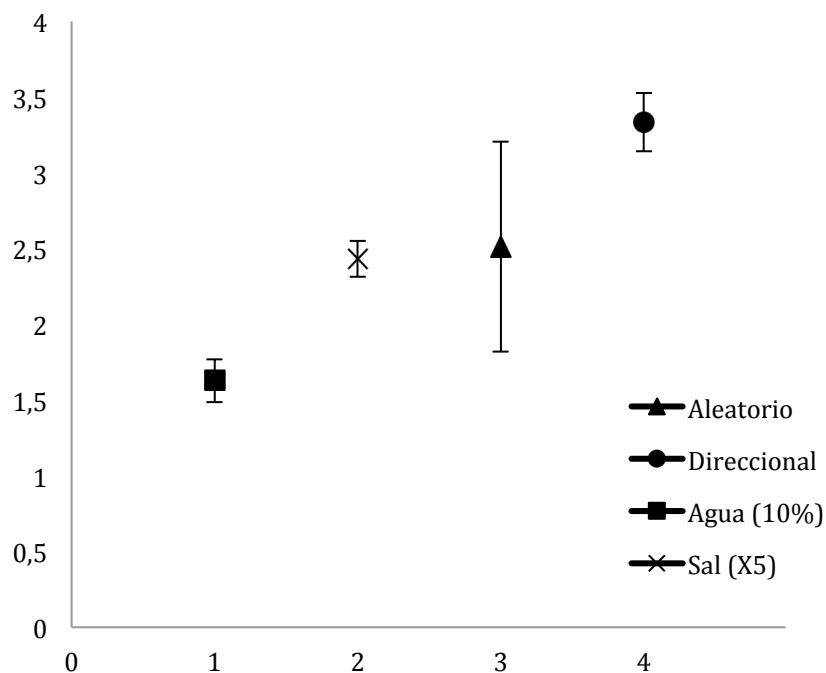


Figura 26 Módulos de Young para los cuatro *scaffolds* de PLLA diferentes

De nuevo, se reafirman las conclusiones sacadas anteriormente. De hecho, se puede apreciar que el agua supone un descenso de un 5% en las propiedades mecánicas por cada 1% que se añade, ya que si hiciésemos una gráfica siendo el módulo de Young de la muestra con el poro direccional el 100%, obtendríamos un descenso de un 25% para las muestras de poro aleatorio y de agua con sal y un descenso de un poco más del 50% para la muestra con un 10% de agua.

6.2 TERMOGRAVIMETRÍA (TGA)

Gracias a la técnica de la termogravimetría, se puede identificar la temperatura a la que degrada un polímero. Para visualizar los datos de dicha degradación, se han representado termogramas de los resultados obtenidos de las dos muestras analizadas.

En la Figura 27 se muestra la curva de degradación del peso de los *scaffolds* respecto a la temperatura.

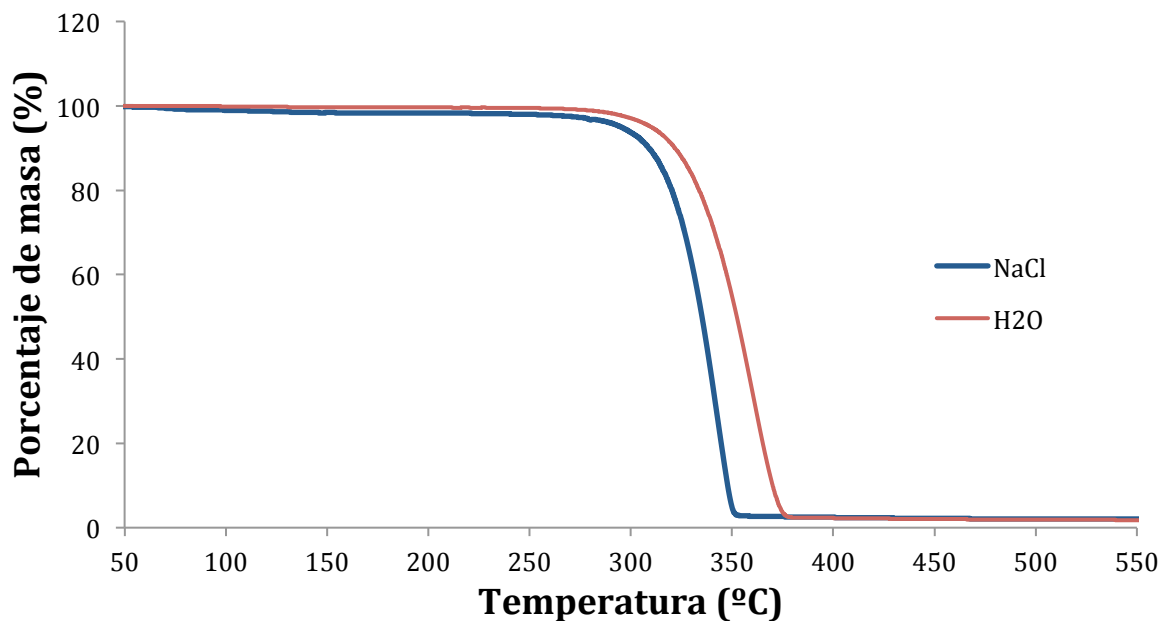


Figura 27 Termograma de *scaffolds* de dioxano+PLLA (7%), uno con un 5% de H₂O y otro con 5% de H₂O+NaCl (disoluciones 7 y 9)

Se aprecia claramente que al añadir la sal, la temperatura de degradación es más baja que para el caso del agua sin sal. Es posible que esto se deba a que al existir iones del NaCl, al aumentar la temperatura esto facilita la ruptura de los enlaces y así resulta en una degradación más temprana.

Se realiza un acercamiento a la zona de la gráfica que queda por debajo del 5% de masa y se representa en la Figura 28 para poder analizarlo.

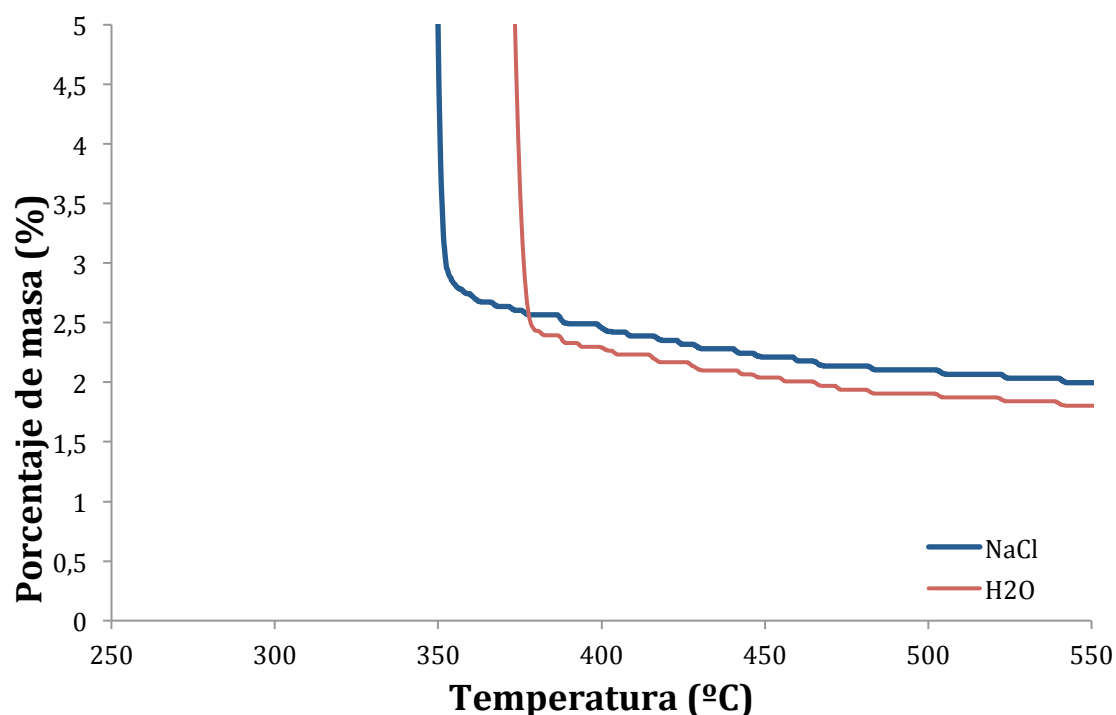


Figura 28 Detalle del último tramo de la gráfica anterior para observar el porcentaje de masa residual de los scaffolds

Se puede comprobar cómo el *scaffold* que contiene el cloruro sódico acaba con un mayor porcentaje másico residual, dado que tiene el añadido de la sal inorgánica y ésta degrada a temperaturas más altas.

Por último, se representan en la Figura 29 las derivadas de ambas curvas respecto a la temperatura para poder obtener los valores aproximados de temperatura a los que se produce la degradación de las muestras, que se corresponden con los picos en la gráfica.

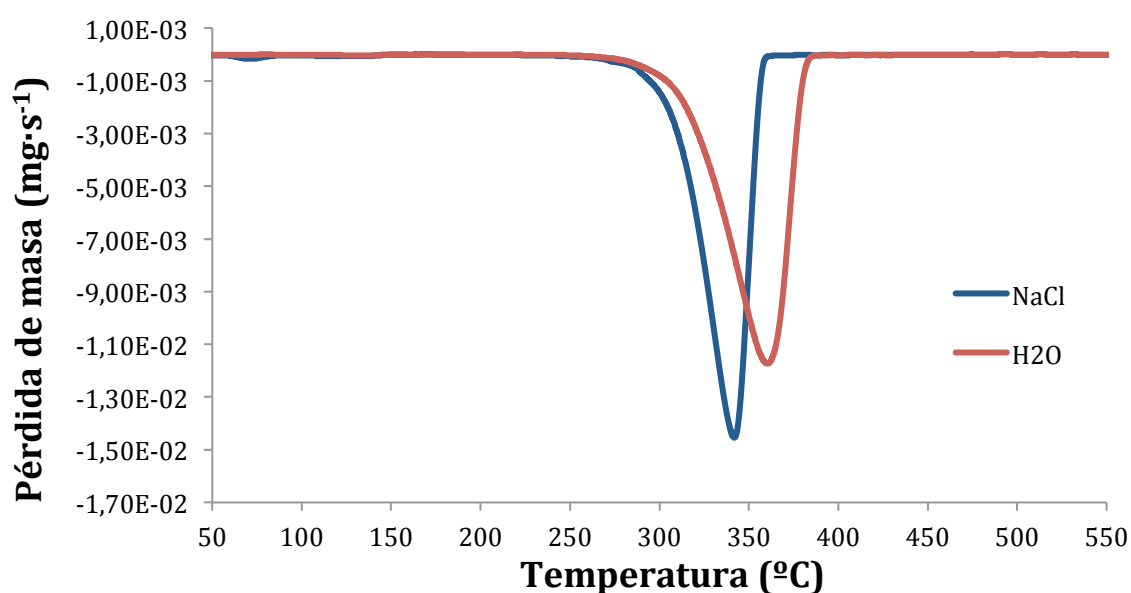


Figura 29 Derivada de la masa respecto a la temperatura de la curva termogravimétrica para las muestras preparadas con H₂O y con H₂O + NaCl

6.3 CALORIMETRÍA DIFERENCIAL DE BARRIDO (DSC)

Con la técnica de calorimetría diferencial de barrido se han podido analizar los diferentes fenómenos que se producen durante un programa térmico en el PLLA utilizado en el proyecto.

Para empezar el análisis de los resultados de la técnica del DSC, observaremos la gráfica de representación de la curva de flujo de calor (Figura 30).

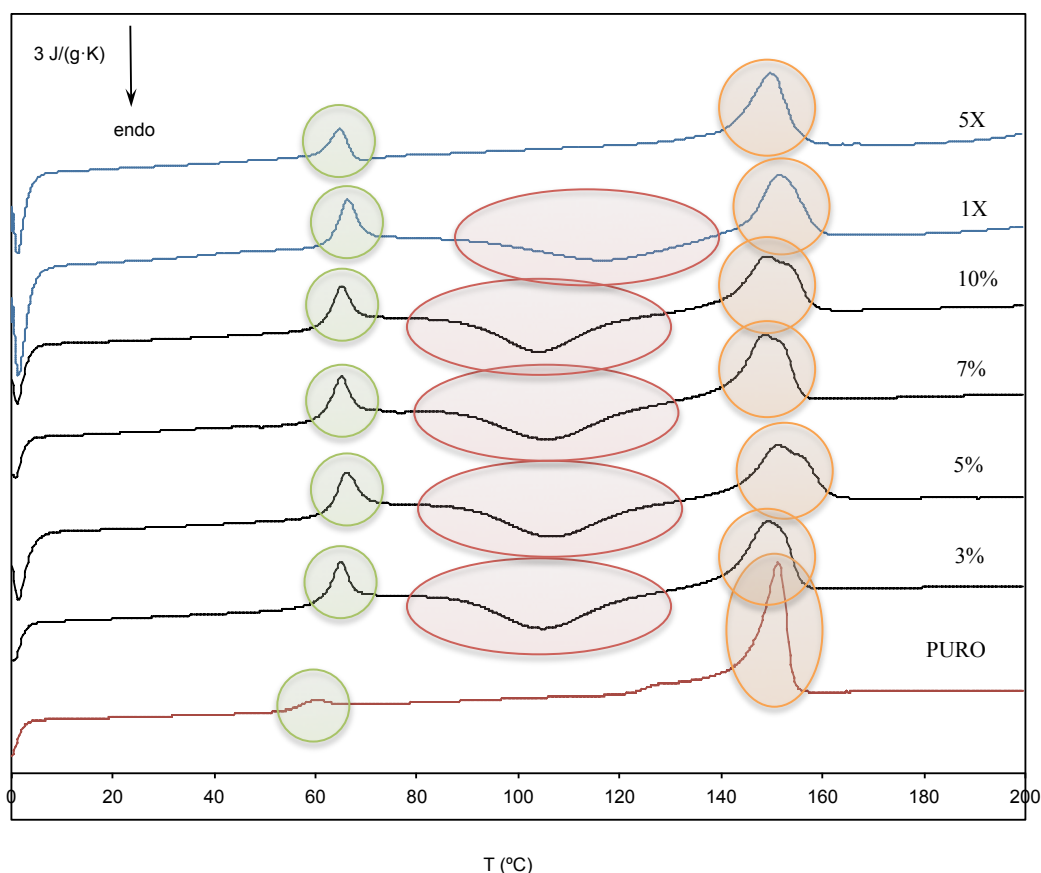


Figura 30 Gráfico DSC de calentamiento de diferentes estructuras de PLLA: una con PLLA puro, cuatro con PLLA proveniente de disoluciones con diferentes concentraciones (3, 5, 7 y 10%) y dos con la disolución de PLLA 7% con sal disuelta en agua (5%), una con cantidad de sal base (1X) y la otra con cinco veces más sal (5X)

Este tipo de gráfica de calentamiento de un polímero consta de tres partes fácilmente diferenciables: la transición vítrea (rodeada con el círculo verde), la fase de cristalización fría (rodeada con la elipse roja) y la fase de fusión (rodeada con el círculo naranja).

Transición vítrea

La transición vítrea es el momento en el que un polímero pasa de tener una cierta capacidad calorífica a ver como ésta es aumentada después del punto de inflexión (T_g).

Podemos apreciar una transición vítrea muy similar en todos los casos excepto para el PLLA puro. Esto se ve reflejado en una temperatura del punto de inflexión media de 64,16 °C, con una desviación estándar de 0,68. Mientras tanto, la temperatura del punto de inflexión en el caso del PLLA puro es de 56,89 °C.

Este fenómeno probablemente venga dado por el pico de envejecimiento que se observa en todas las muestras excepto la del PLLA puro. Este pico se produce por los diferentes tratamientos térmicos que ha sufrido el PLLA, que hacen que presente cierta resistencia adicional en la transición vítrea, que se traduce en problemas a la hora de determinar el punto exacto de la temperatura de transición vítrea por parte del equipo DSC.

Fase de cristalización fría

Pasada la transición vítrea, los polímeros en ocasiones ganan suficiente energía como para crear nuevos cristales, liberando así calor. Esta liberación de calor se traduce en una depresión en la curva de flujo de calor – T^a.

Se ve en la gráfica anterior que en el caso de las diferentes concentraciones de PLLA todas las muestras presentan una curva de cristalización fría muy similar. Sin embargo, al añadir la sal vemos como el proceso de cristalización fría se reduce y la curva se mueve un poco hacia temperaturas más altas porque el tipo de cristales que se forman es diferente. De hecho, en el caso de la muestra con mayor cantidad de sal, no se presenta cristalización fría, ya que durante el procesado del *scaffold* las muestras que contienen cloruro sódico cristalizan en mayor medida debido a que las sales actúan como núcleo de cristalización. La muestra de PLLA puro, del mismo modo que las muestras que contienen NaCl, tampoco presenta ningún tipo de cristalización adicional durante el calentamiento.

Fase de fusión

Cuando se alcanza la temperatura de fusión (T_m), se produce la ruptura de todos los enlaces cristalinos. Es por ello que se necesita un gran aporte de calor, que se ve reflejado como el gran pico del final de la gráfica (redondeado de color naranja). El área de la curva de dicho pico representa ese aporte de calor, dándonos la entalpía del proceso de fusión.

En el caso de los *scaffolds* sin cloruro sódico, se observa de nuevo que son muy similares, mostrando un pico de fusión irregular, probablemente debido a que no todos los cristales son iguales y tienen varias temperaturas de fusión. Las disoluciones con sal presentan una forma parecida a las anteriores, pero en este caso con una forma más cercana a la de una campana de Gauss. Para finalizar, la muestra de PLLA puro tiene una curva con mucha mas pendiente y de parecida amplitud.

La T_m media de todas las muestras es de 150,06 °C, con una desviación estándar de 1,26.

Cristalinidad

Para obtener la cristalinidad másica (χ_c) o inicial de las muestras, se ha utilizado la Ecuación 13:

$$\chi_c = \frac{\Delta H_m - \Delta H_c}{\Delta H_m^0} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 13}$$

donde ΔH_m es la entalpía del proceso de fusión, ΔH_c es la entalpía de cristalización fría y ΔH_m^0 es la entalpía del proceso de fusión del material 100% cristalino.

También se calculó la cristalinidad de fusión (χ_m) (Ecuación 14), que no tiene en cuenta la cristalización fría, por lo que la ecuación quedaría así:

$$\chi_m = \frac{\Delta H_m}{\Delta H_m^0} \cdot 100 \quad \text{Ecuación 14}$$

En la Tabla 9 se muestran las entalpías de los *scaffolds* y su cristalinidad (χ_c) (conocido que el ΔH del PLLA 100% cristalino = 93 J/g [25]):

Tabla 9 Cristalinidad de las muestras del DSC

MUESTRA	ΔH_m (J/g)	ΔH_c (J/g)	χ_m (%)	χ_c (%)
PLLA 3%	24,042	25,85	25,85	1,4
PLLA 5%	23,095	24,83	24,83	0,98
PLLA 7%	24,15	25,97	25,97	2,84
PLLA 10%	23,47	25,23	25,23	2,11
PLLA 7% + NaCl	20,11	21,61	21,61	2,13
PLLA 7% + NaCl x5	23,63	25,41	25,41	25,41
PLLA puro	36,63	38,96	38,96	38,96

Se puede observar a raíz de los resultados de χ_m que la concentración de PLLA en las disoluciones, así como el hecho de que contenga sal o no, no afecta en la cristalinidad final de las muestras (cristalinidad de fusión), ya que todos los resultados son muy similares y la variación que hay entre ellos viene dada por el error grande que se arrastra de todos los procesos y cálculos. También podemos ver que al disolver el PLLA (especialmente por el hecho de que se disuelva a 50°C) se obtiene un PLLA más amorfo, comparándolo con el PLLA puro del que se parte, que ya era bastante amorfo de por sí.

No obstante, para la cristalinidad másica χ_c se puede apreciar un hecho muy significativo: al tratar térmicamente los *scaffolds*, estos pierden toda la cristalinidad, pasando a ser casi absolutamente amorfos. Los cristales de estos *scaffolds* que se funden en la fase de fusión provienen todos de la cristalización fría. No obstante, al añadir suficiente NaCl se crean núcleos de cristalización que permiten al material adquirir cierta cristalinidad, evitándose luego la fase de cristalización en frío, por lo que la χ_c es igual a la χ_m . En el caso del PLLA puro, la cristalinidad inicial también es la misma que la de fusión, dado que el estado inicial de este polímero es semi-cristalino.

6.4 MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE EMISIÓN DE CAMPO (FESEM) Y MICROSCOPIO ELECTRÓNICO DE BARRIDO (SEM)

Gracias a ambos microscopios electrónicos, se pudo observar la morfología de los *scaffolds* fabricados, pudiendo así observar, analizar y comparar los poros y su distribución según el tipo de disolución y el método utilizados para la creación de la estructura del *scaffold*.

Todas las muestras analizadas eran previamente cortadas congelándolas con nitrógeno líquido y rompiéndolas aprovechando la fragilidad del material congelado. Esto propició que algunas de las superficies fuesen irregulares y a veces presentasen morfologías diferentes por como se había roto la muestra. No obstante, se consideró más adecuado esto para poder observar bien los poros que dejar marcas con una cuchilla, que podía ser más confuso y no dejaba ninguna zona de corte limpio.

Por orden cronológico de desarrollo del proyecto, se quiso observar en primera instancia las diferencias entre distintas concentraciones de PLLA en dioxano con los dos métodos de extracción de disolvente presentados anteriormente en este trabajo: el *Freeze-Extraction* y el *Freeze-Drying*.

Como era la primera serie de muestras que se observaban, se quisieron observar a conciencia las muestras, haciendo especial hincapié en la sección, que iba a ser donde los resultados para la consecución del objetivo del proyecto iban a mostrarse, pero también se vieron tanto la cara superior como la inferior de las muestras para ver si había diferencias tanto entre los métodos de extracción como en las diferentes concentraciones.

Así pues, se observaron primero 8 muestras, la mitad extraídas mediante *Freeze-Extraction* y la otra mitad mediante *Freeze-Drying*. De las 4 muestras extraídas por ambos métodos, cada una tenía una concentración diferente de PLLA en dioxano, a saber 3, 5, 7 y 10%. Se quería añadir una muestra de 15% también, pero cuando se observó la viscosidad de la misma se descartó por poca practicidad, ya que no se creía que fuese a ser adecuada tanta cantidad de soluto y ya se tenía la del 10% como control de alta concentración.

Estos son los resultados de las muestras de *Freeze-Extraction*, en las Figuras 31 – 38:

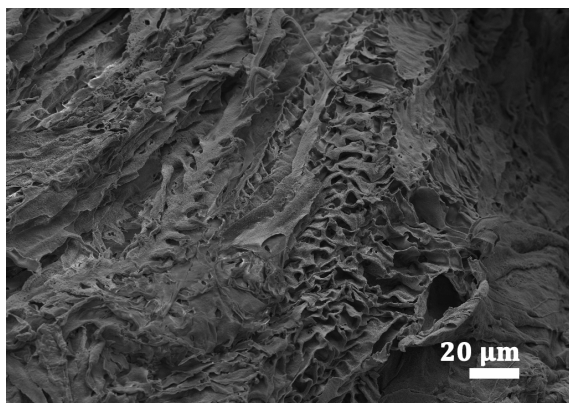


Figura 31 Diox+PLLA (3%) *Freeze-Extraction*

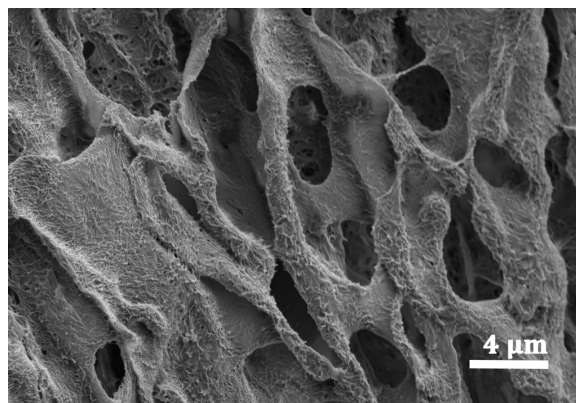


Figura 32 Diox+PLLA (3%) *Freeze-Extraction*. Detalle de poro

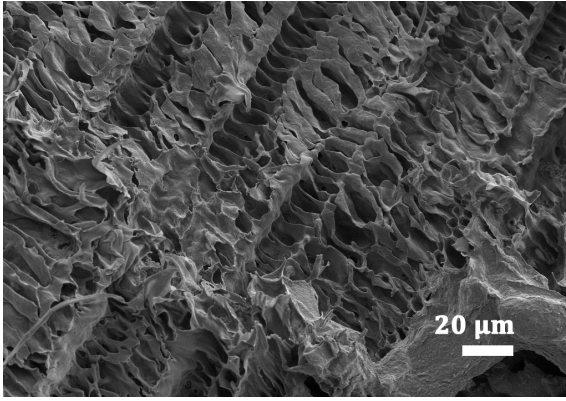


Figura 33 *Diox+PLLA (5%) Freeze-Extraction*

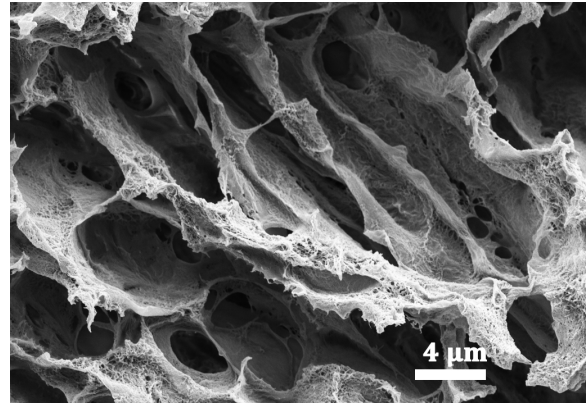


Figura 34 *Diox+PLLA (5%) Freeze-Extraction. Detalle de poro*

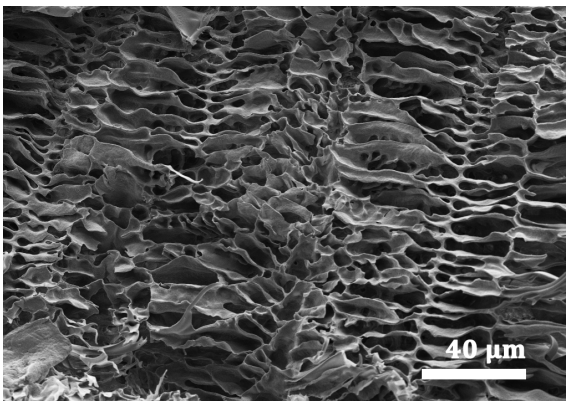


Figura 35 *Diox+PLLA (7%) Freeze-Extraction*

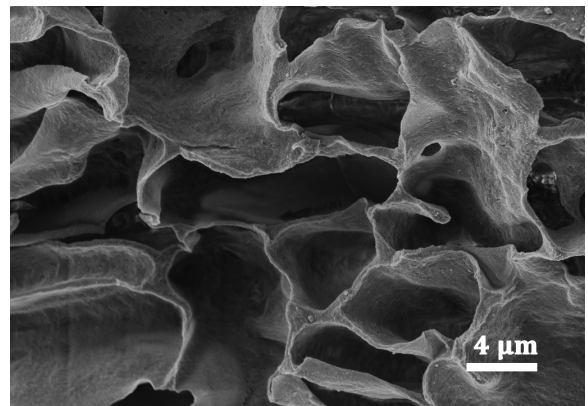


Figura 36 *Diox+PLLA (7%) Freeze-Extraction. Detalle de poro*

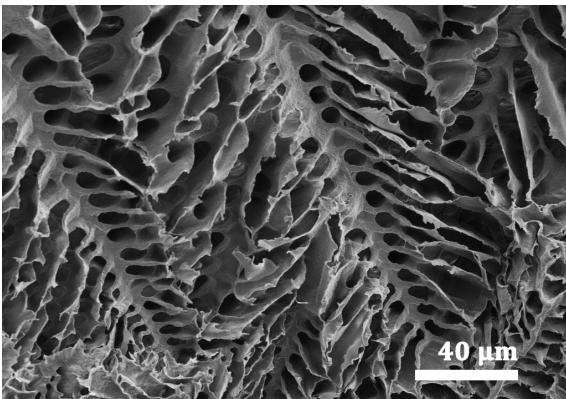


Figura 37 *Diox+PLLA (10%) Freeze-Extraction*

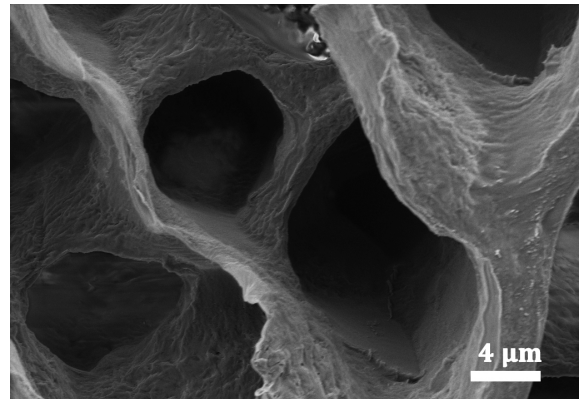


Figura 38 *Diox+PLLA (10%) Freeze-Extraction. Detalle de poro*

Se puede apreciar que hay diferencias en la formación porosa, cuanto más abundante el PLLA, más definido se encuentra el poro y mayores formaciones continuas similares se pueden ver.

Los poros parecen haber sido conformados con un material viscoso, probablemente debido al tipo de extracción, ya que los lavados son un proceso de extracción de

dioxano lento comparados con la liofilización y que además se hace en un medio líquido.

Para el *Freeze-Drying* con el poro aleatorio, se obtuvieron dos tandas de muestras, siendo las más significativas las mostradas en las Figuras 39 – 46:

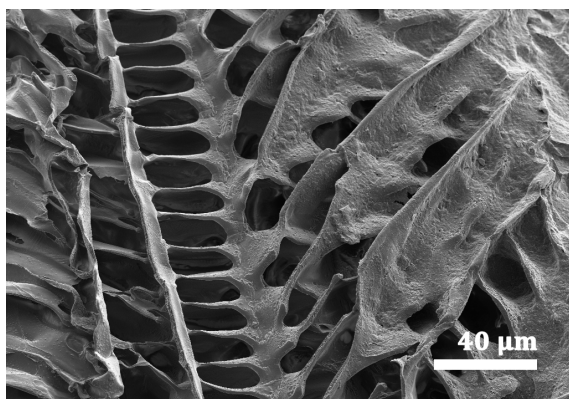


Figura 39 Diox+PLLA (3%) Freeze-Drying

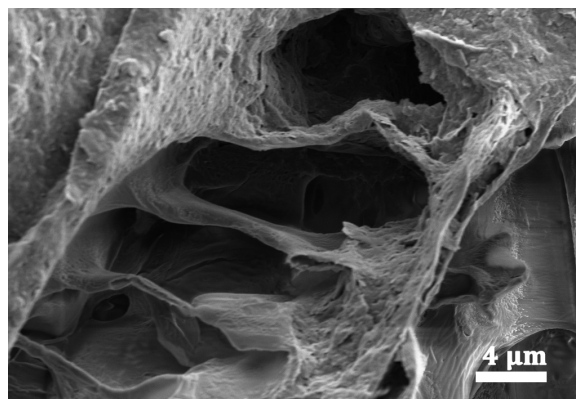


Figura 40 Diox+PLLA (3%) Freeze-Drying. Detalle de poro

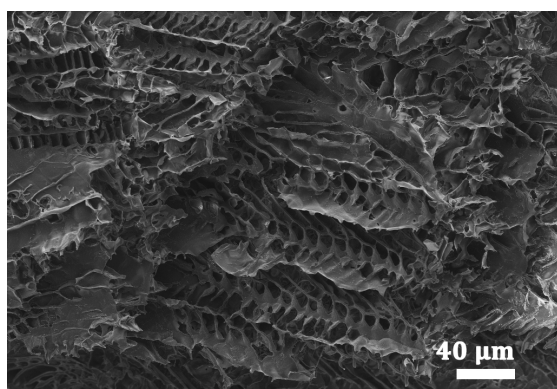


Figura 41 Diox+PLLA (5%) Freeze-Drying

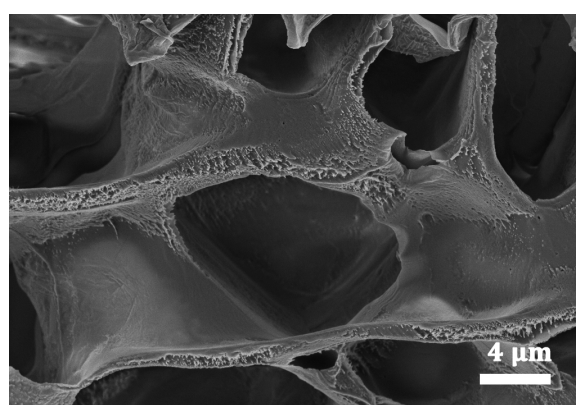


Figura 42 Diox+PLLA (5%) Freeze-Drying. Detalle de poro

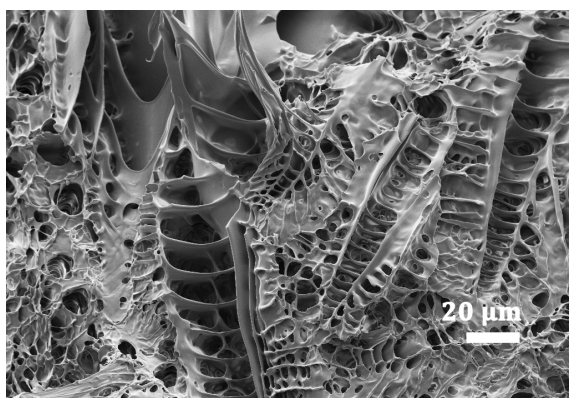


Figura 43 Diox+PLLA (7%) Freeze-Drying

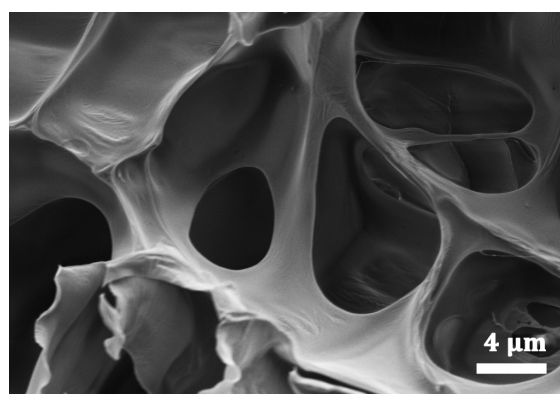


Figura 44 Diox+PLLA (7%) Freeze-Drying. Detalle de poro

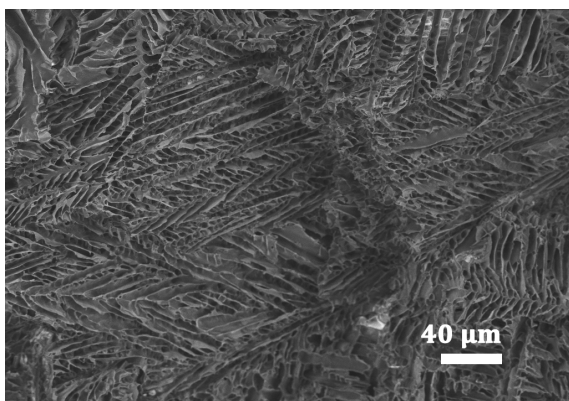


Figura 45 Diox+PLLA (10%) Freeze-Drying

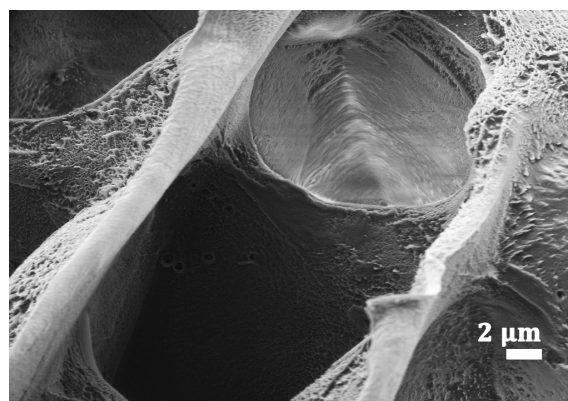


Figura 46 Diox+PLLA (10%) Freeze-Drying. Detalle de poro

Se puede observar claramente la mejoría respecto a las muestras de *Freeze-Extraction* en la definición de los poros. Las porosidades obtenidas con la liofilización se muestran con los bordes más definidos, con una estructura mucho más limpia. En común tienen la estructura “de escalera” que se puede observar en las porosidades.

El tamaño de poro se puede apreciar cómo tiene una relación inversamente proporcional a la concentración de PLLA: según aumenta ésta última, los poros se hacen más pequeños. Más adelante, en el análisis de densidad, se incluirá el tamaño de los poros, analizado con la escala.

El *Freeze-Drying* se había considerado inicialmente como el método a tener en cuenta dado que lo que se buscaba era la direccionalidad de poro y para conseguir ésta se necesitaba crear un gradiente de temperaturas en la congelación que sólo se podía obtener aumentando la altura total de la disolución dentro del recipiente en el que se congelaba. Esto en sí ya suponía un problema para la *Freeze-Extraction* dado que las zonas centrales de la muestra se encontraban a difícil alcance del etanol. Por ello, dado que el *freeze-drying* era nuestra opción primordial y gracias a la comprobación de que es un método que permite obtener estructuras porosas morfológicamente similares a las de *freeze-extraction* e incluso las mejora gracias a un poro mejor definido, se consideraron como óptimos los resultados y se pasó a la fase de alineado de poro.

Como las estructuras obtenidas con el 7% se mostraban las más prometedoras y aseguraban una suficiente cantidad de PLLA para que no se resintiesen sus capacidades mecánicas, en adelante todas las disoluciones utilizadas parten como base de esta concentración.

Los poros alineados se observaron en primera instancia con el SEM, por lo que la calidad de la imagen disminuye, pero se aprecia perfectamente la aparición de una clara direccionalidad en el crecimiento de los poros. Se probó primero con el montaje en el que directamente la muestra entraba en contacto con el nitrógeno líquido (se probaron varios tiempos, de 20 minutos a 1 hora, por si la congelación no era completa en los primeros, aunque luego se apreció el mismo resultado, por lo que con alrededor de 20 minutos ya era suficiente para que se congelase completamente) y después con la placa de aluminio entre el nitrógeno y la muestra, para propiciar una congelación más lenta y controlada.

Se han dibujado líneas para marcar más evidentemente dicha direccionalidad, como se aprecia en las Figuras 47-54.

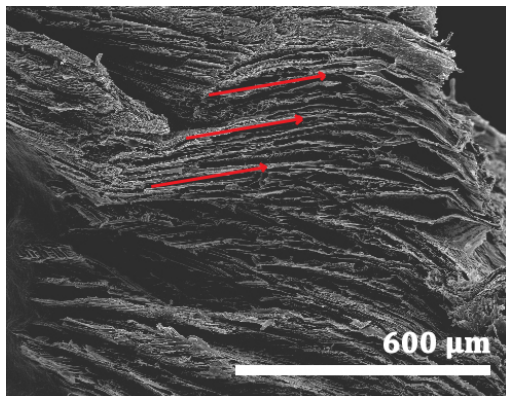


Figura 47 Diox+PLLA (7%) Alineación de poros. Muestra en contacto directo con el nitrógeno

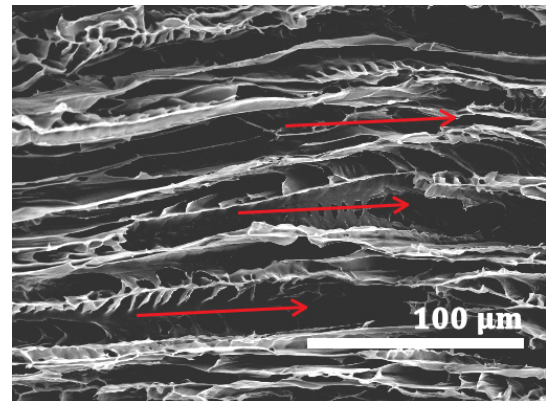


Figura 48 Diox+PLLA (7%) Alineación de poros. Muestra en contacto directo con el nitrógeno. Detalle de los canales

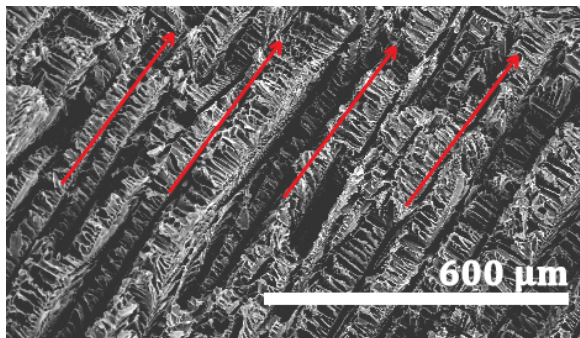


Figura 49 Diox+PLLA (7%) Alineación de poros. Muestra en contacto directo con el nitrógeno (en este caso, con más tiempo de congelación)

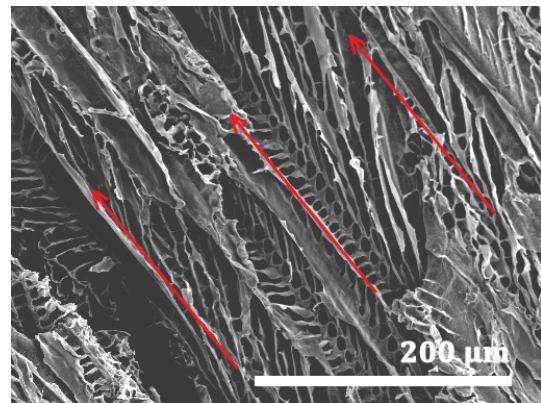


Figura 50 Diox+PLLA (7%) Alineación de poros. Muestra en contacto directo con el nitrógeno (en este caso, con más tiempo de congelación). Detalle de los canales

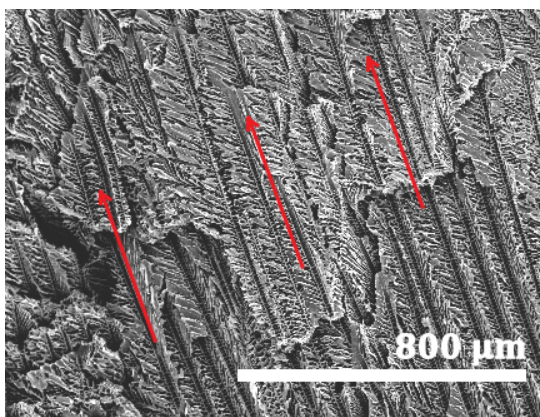


Figura 51 Diox+ PLLA (7%) Alineación de poros. Muestra en contacto con la placa de aluminio (1)

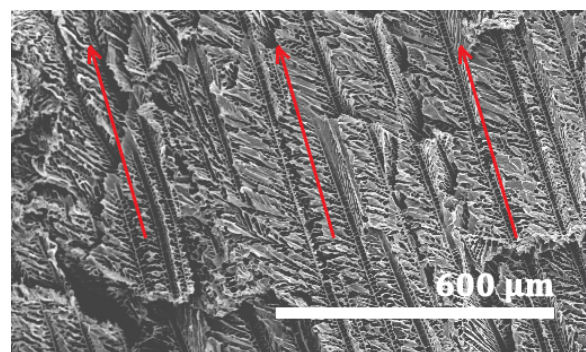


Figura 52 Diox+ PLLA (7%) Alineación de poros. Muestra en contacto con la placa de aluminio (2)

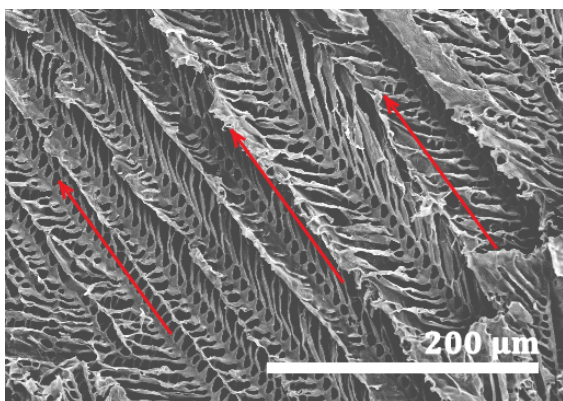


Figura 53 *Diox+ PLLA (7%) Alineación de poros.*
Muestra en contacto con la placa de aluminio.
Detalle de los canales (1)

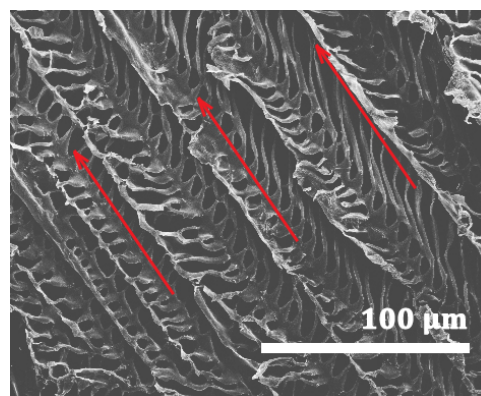


Figura 54 *Diox+ PLLA (7%) Alineación de poros.*
Muestra en contacto con la placa de aluminio.
Detalle de los canales (2)

Como se aprecia, el método para obtener la direccionalidad de poros fue totalmente exitoso. No obstante, entre ambos procedimientos, destaca la homogeneidad de los canales de poros obtenida con la placa de aluminio. Esto viene a mostrar que un enfriamiento más lento y controlado propicia el crecimiento de los cristales del solvente de manera totalmente direccional en la dirección en que se congelan.

Cabe decir que el hecho de que en algunas de las muestras de poro aleatorio se encontrase direccionalidad se debe a que la introducción de los viales en el nitrógeno líquido se hacía de manera cuidadosa, por lo que en cierto modo se propiciaba una congelación direccional. No obstante, al no haber ni gradiente de temperaturas ni control del proceso de congelación, lo que en unas zonas podía verse como poro direccional, era en otras totalmente aleatorio. Por ello, el método válido para obtener los canales que se buscaban como objetivo principal, es la congelación controlada, especialmente el caso de las muestras que tienen una placa de un material conductor entre ellas y el nitrógeno, además de los lados aislados.

Finalmente, se analizaron las muestras sintetizadas con las disoluciones **6-10**, que son las tres que llevaban agua y las dos que llevaban sal.

Para el agua, se quiso observar la influencia que tenía sobre la estructura del *scaffold*. En el caso de disolución con sal, el objetivo fue que se apreciaran cristales de NaCl en la superficie de los poros.

Como se ha mencionado en el apartado de preparación de disoluciones, todas tenían de base la disolución de Dioxano+PLLA (7%). Además, el proceso de congelado se hizo con el que, como se acaba de comprobar, se obtenían mejores resultados: congelado direccional con la placa de aluminio.

Éstos fueron los resultados del análisis microscópico de las muestras con agua, tal y como se aprecia en las Figuras 55-60:

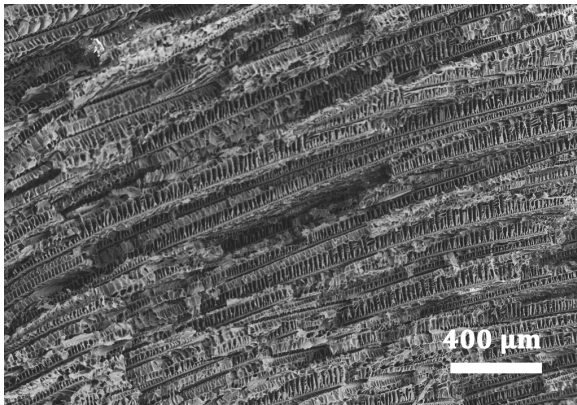


Figura 55 *Diox+PLLA (7%) + H₂O (2%)*

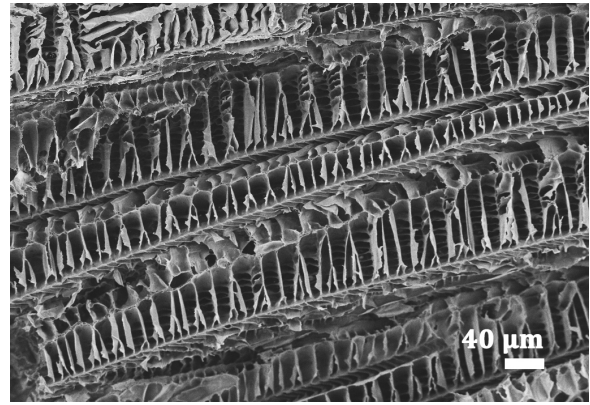


Figura 56 *Diox+PLLA (7%) + H₂O (2%)*. Detalle de los canales

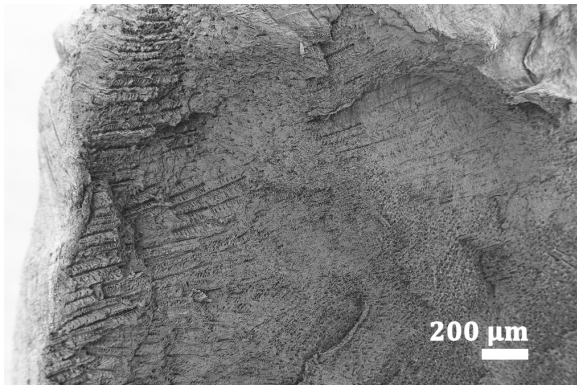


Figura 57 *Diox+PLLA (7%) + H₂O (5%)*

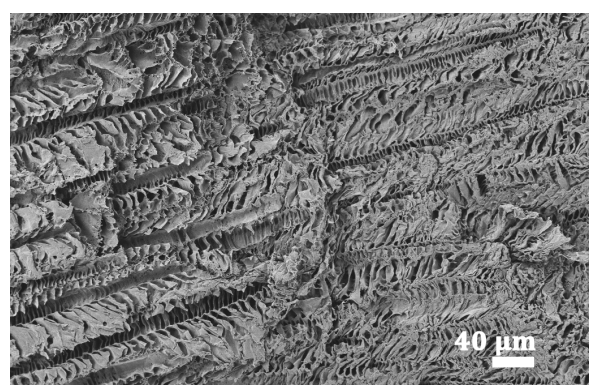


Figura 58 *Diox+PLLA (7%) + H₂O (5%)*. Detalle de los canales

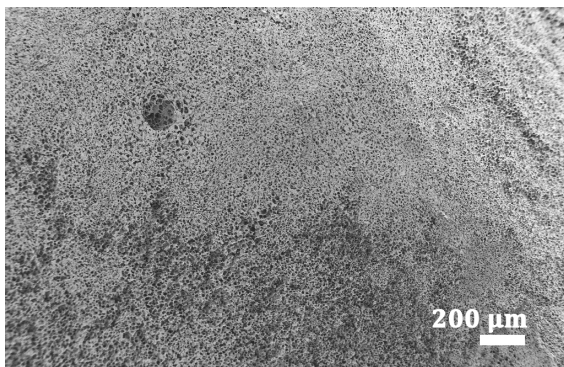


Figura 59 *Diox+PLLA (7%) + H₂O (10%)*

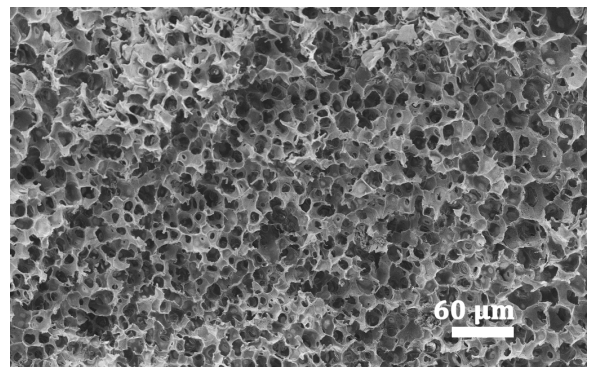


Figura 60 *Diox+PLLA (7%) + H₂O (2%)*. Detalle de los poros

Tal y como se puede apreciar, el introducir en la disolución agua afecta a la formación de los cristales en la fase de congelación, entorpeciendo así la creación de las estructuras porosas. Se puede ver que a mayor concentración de agua en la disolución, peor es la definición de los poros y de los canales creados por la direccionalidad en la congelación, hasta el punto de desaparecer por completo dichos

canales en la disolución con un 10% de agua y aparecer una morfología de poros que se asemeja más a una superficie llena de cráteres que a lo que se ha visto en las demás imágenes, que forma una estructura más “de escalera”.

En el caso de las disoluciones a las que se añadió sal también, los resultados fueron los que se aprecian en las Figuras 61-66:

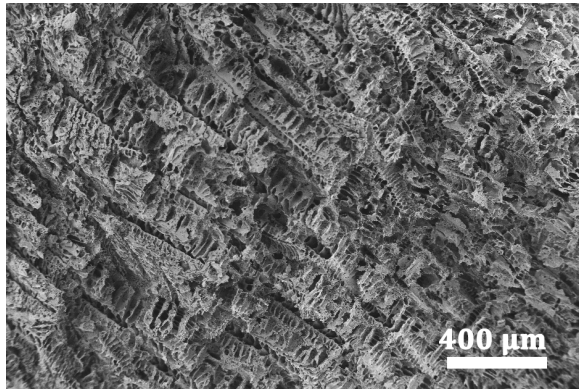


Figura 61 *Diox+PLLA (7%) + H₂O+NaCl (5%)*

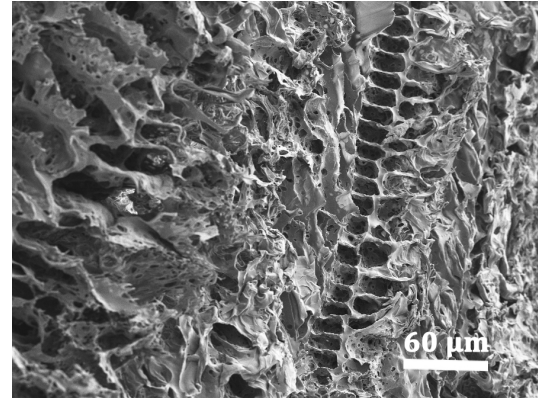


Figura 62 *Diox+PLLA (7%) + H₂O+NaCl (5%)*. Detalle de los canales

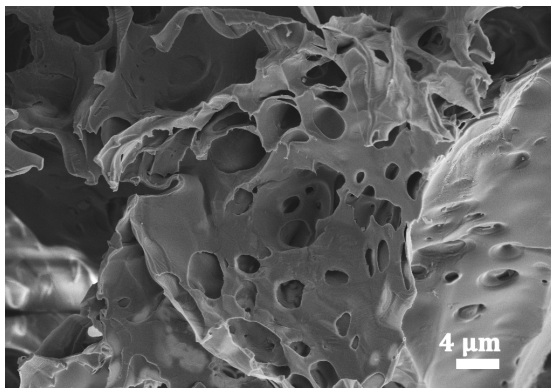


Figura 63 *Diox+PLLA (7%) + H₂O+NaCl (5%)*. Detalle de poro y microporosidades

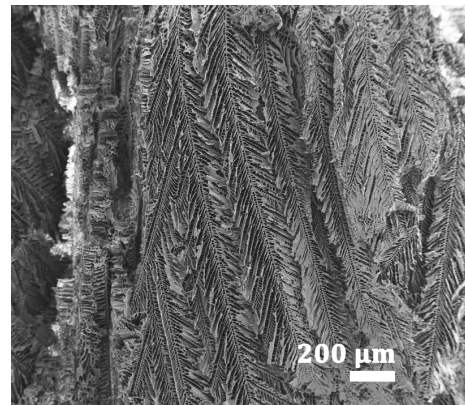


Figura 64 *Diox+PLLA (7%) + (H₂O+5·NaCl) (5%)*

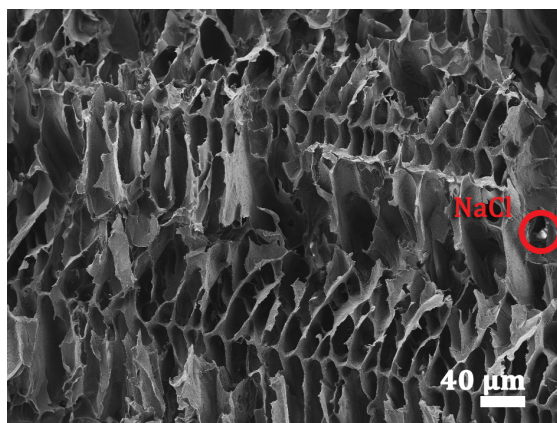


Figura 65 *Diox+PLLA (7%) + (H₂O+5·NaCl) (5%)*. Detalle de canales con cristales de NaCl (1)

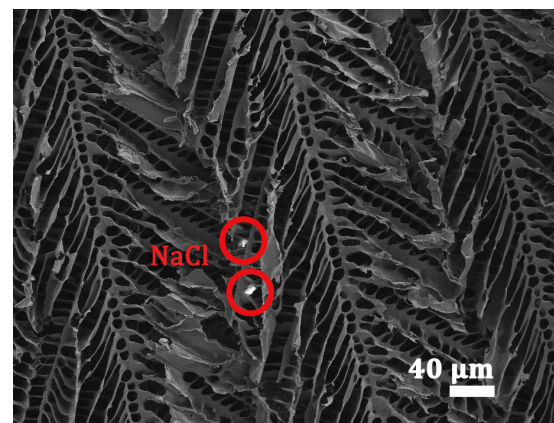


Figura 66 *Diox+PLLA (7%) + (H₂O+5·NaCl) (5%)*. Detalle de canales con cristales de NaCl (2)

Como puede verse, el tener un 5% de agua (pese a llevar sal) ha afectado a la morfología porosa, tal y como sucedía en el caso sin sal. No obstante, en el caso con una cantidad de sal 5 veces mayor, se encontraron zonas en las que había canales de poros más definidos, por lo que parece que al estar el agua ligada a la sal no interfiere tanto en la disolución de dioxano+PLLA. Esto se pudo también comprobar a simple vista al añadir el agua en las disoluciones, puesto que el agua salada no producía ningún efecto visible importante, mientras que el agua sin sal hacía que precipitase el PLLA, necesitándose más agitación y T^a para disolver los coágulos que se formaban.

También se puede comprobar que las cantidades de sal son pequeñas para poder manifestarse en abundancia en los *scaffolds*. De hecho, en la primera disolución (disolución 8) no se pudieron encontrar cristales de NaCl en toda la superficie del corte de la muestra. En la disolución 9, la que contenía 5 veces más sal que la anterior, sí que se pudieron ver algunos cristales pequeños de NaCl. Se identificaron como tal ya que tenían una forma cúbica característica de este tipo de cristales [26].

6.5 DENSIDAD Y POROSIDAD

La caracterización por densidad y porosidad nos permite hacernos una idea de la cantidad de poros que hay en el volumen total del *scaffold*. Se ha añadido también un estudio del tamaño de poro, que se ha obtenido analizando las imágenes del FESEM del apartado anterior.

En la Tabla 10 se han representado los valores de tamaño de poro, densidad y porosidad de las muestras analizadas.

Tabla 10 Tamaño de poro, densidad y porosidad de *scaffolds*

Nº	MUESTRA	TAMAÑO DE PORO (µm)	DENSIDAD (g/mL)	POROSIDAD (%)
1	PLLA 3% (Aleat.)	15 – 40	1,21	89,59
2	PLLA 5% (Aleat.)	10 – 25	1,26	87,84
3	PLLA 7% (Aleat.)	5 – 20	1,25	86,61
4	PLLA 10% (Aleat.)	5 – 10	1,26	84,36
5	PLLA 7% (Direc.) contacto directo	5 – 15	1,26	82,99
6	PLLA 7% (Direc.) contacto aluminio	5 – 12,5	1,25	84,27
7	PLLA 7% + 5% H ₂ O (Direc.)	5 – 20	1,26	86,58
8	PLLA 7% + 10% H ₂ O (Direc.)	5 – 30	1,25	86,04

De los datos obtenidos se puede deducir que a más concentración de PLLA en la disolución utilizada para preparar el *scaffold*, menor porosidad tendrá éste. También es interesante destacar que las muestras con poro direccional resultaron ser menos porosas que las aleatorias. Esto último probablemente se deba a que como los *scaffolds* con poro aleatorio tienen mayor tamaño de poro en algunos casos, con el método de caracterización utilizado es posible que haya entrado más fácilmente el n-octano dentro de las muestras, haciendo que el *scaffold* tuviera menos aire dentro y por tanto acabase resultando en una mayor porosidad.

Es curioso también que el agua no parece afectar a la porosidad. Cambia la morfología de los poros, haciéndolos más aleatorios y afectando a las propiedades mecánicas, pero la porosidad se mantiene en valores similares a los de la misma concentración de PLLA con poro aleatorio.

Las densidades son las mismas prácticamente para todos los *scaffolds* analizados. La única que presenta una diferencia algo más notoria es la muestra 1 y probablemente se deba a el error que pueda haber ocurrido en las medidas, ya que al ser la primera muestra analizada el método aún no estaba tan practicado como en las siguientes.

En cuanto a los resultados de tamaño de poro, se aprecia cómo a menores concentraciones de PLLA los poros tienen un rango más amplio de tamaños, que se va disminuyendo junto con el tamaño en general a medida que se aumenta la concentración. Es notorio también que los poros alineados también producen una disminución del rango de tamaño respecto a su misma concentración con poro aleatorio. El agua afecta haciendo que los poros tengan más variabilidad de tamaño y, por lo tanto, aumentando el rango de tamaño de poros.

A continuación se representará una gráfica con los resultados mostrados en la Tabla 10. En la , se han rellenado de color rojo las barras que representan la porosidad de los *scaffold* con poros aleatorios, de verde las que representan la porosidad de los de poro alineado y de morado las que representan la porosidad de las muestras con agua. La densidad se ha representado con la línea de puntos azul.

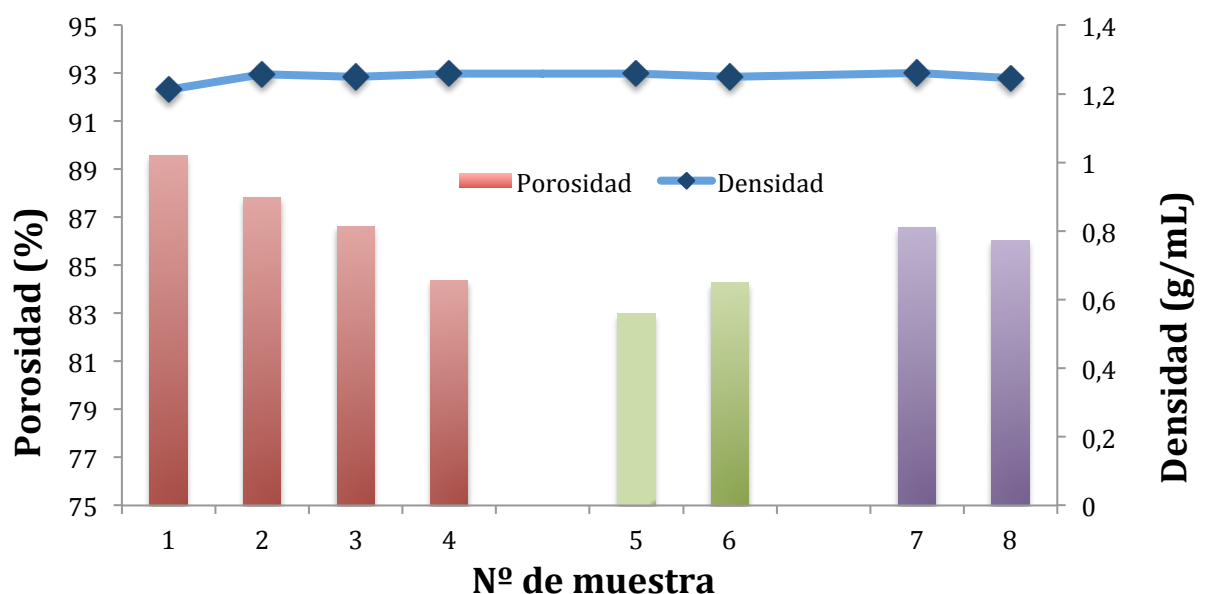


Figura 67 Gráfica con la porosidad y la densidad de las muestras analizadas

7 CONCLUSIONES

Se ha logrado obtener estructuras porosas con los dos métodos propuestos: *Freeze-Drying* y *Freeze-Extraction*. Se ha comprobado que el primero presenta mejor morfología de poro, por lo que se considera el *Freeze-Drying* como el mejor método de obtención de *scaffolds* en este proyecto.

Se ha conseguido obtener *scaffolds* con poros unidireccionales alineados utilizando el método de *Freeze-Drying* en un proceso de congelación controlada, creando un gradiente de temperaturas en la dirección que se desea obtener la porosidad. Se considera que el montaje en el que se utiliza una placa de aluminio como barrera de intercambio de calor entre la disolución y el nitrógeno líquido es el más adecuado de todos los probados porque ofrece un mejor control de la congelación.

Se ha analizado la morfología de los *scaffolds* gracias a la microscopía electrónica. Con esto se ha podido determinar que la disolución con un 7% de PLLA en dioxano (w/w) era la más adecuada para aplicaciones de regeneración muscular por tener una buena morfología de poro y a la vez suficiente material como para que sus propiedades mecánicas no se viesan resentidas.

Los ensayos térmicos realizados indican que los *scaffolds* cargados con cloruro sódico presentan una mayor cristalinidad inicial. No obstante, este contenido en sales también supone una disminución en la temperatura de degradación del soporte.

En cuanto a las características mecánicas, se ha podido constatar que el agua en la disolución con PLLA y dioxano afecta muy negativamente al módulo elástico, disminuyéndolo notablemente, con independencia de contener sales o no. También se ha obtenido un resultado muy satisfactorio para los *scaffolds* con el poro alineado, ya que se ha podido comprobar que presentan un módulo de Young más elevado que los *scaffolds* con la misma cantidad de PLLA y el poro aleatorio.

La densidad de las muestras no parece sufrir variaciones significativas en ninguna de las disoluciones preparadas. No obstante, la porosidad sí que varía con la concentración de polímero en la disolución: a mayor cantidad de PLLA, menor porosidad. Se ha observado también que el agua parece no tener influencia alguna en la porosidad. Sin embargo, los *scaffolds* con poro alineado presentan una ligera disminución en la porosidad respecto a los que tenían el poro aleatorio.

En resumen, se ha cumplido el objetivo de sintetizar *scaffolds* con poros alineados para crear una matriz extracelular artificial que sirva de soporte para el cultivo de células musculares. Así mismo, se ha realizado la caracterización físico-química y morfológica de los *scaffolds* preparados.

Y ya para concluir, se puede afirmar que, a falta de más pruebas y análisis más exhaustivos que den validez a los datos presentados en este proyecto, los *scaffolds* preparados con una disolución de dioxano + PLLA (7%) (w/w), utilizando el método de *Freeze-Drying* con congelación controlada con una placa de aluminio como medio de intercambio de calor para obtener poros alineados, es la más adecuada para el cultivo *in vitro* de células musculares. Además, se ha comprobado la presencia de cristales de cloruro sódico en los *scaffolds*; sin embargo es necesaria la realización de más experimentos para determinar la concentración requerida de diferentes sales para la liberación de iones en aplicaciones de ingeniería tisular.

8 GLOSARIO DE TÉRMINOS

- PLLA: Ácido poli-L-láctico, del inglés *Poly-L-Lactic Acid*
- FESEM: Microscopio electrónico de emisión de campo, del inglés *Field Emission Scanning Electron Microscope*
- SEM: Microscopio electrónico de barrido, del inglés *Scanning Electron Microscope*
- *Scaffolds*: Andamios en inglés, son los soportes celulares de PLLA en este proyecto
- CBIT: Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular
- UPV: Universitat Politècnica de València
- ETSID: Escuela Técnica Superior de Ingeniería del Diseño

9 PLIEGO DE CONDICIONES

En este apartado se incluirán los elementos a tener en cuenta previos a la realización del proyecto. Se dividirá en:

- **Pliego de condiciones generales:** donde se recogerán las condiciones legales y normativas aplicables al proyecto.
- **Pliego de especificaciones técnicas:** donde se especificarán las características técnicas y de seguridad de los materiales y los equipos utilizados.
- **Pliego de prescripciones de gestión de los residuos:** donde se considera todo lo relacionado con las operaciones de tratado de residuos.

9.1 PLIEGO DE CONDICIONES GENERALES

9.1.1 NORMATIVA

Se ha seguido la normativa establecida por el C.B.I.T. en cuanto a seguridad en el trabajo, salud y protección medioambiental. Todas las normas para esto están incluidas en el “Manual Básico de Seguridad y Prevención de Riesgos del C.B.I.T.”, que a su vez está sujeto al “Manual de Prevención de Riesgos Laborales de la U.P.V.”, así como a toda la normativa vigente para proyectos de investigación experimental, que es el marco en el que el proyecto ha sido llevado a cabo. Todas las normas de seguridad e higiene en el trabajo asumidas, pues, han sido dictaminadas y reguladas por el Ministerio de Trabajo.

La normativa aplicada a este proyecto se enmarca en los denominados “de investigación experimental”, y es la empleada durante todo el trabajo en el laboratorio. Dicha normativa de Seguridad e Higiene en el Trabajo está regulada por el Ministerio de Trabajo. Concretamente, se tiene en especial consideración en cumplimiento de la Ordenanza General de Seguridad e Higiene en el trabajo, que corresponde a lo estipulado en el B.O.E nº 269 del 10 noviembre de 1995 en referencia a la ley ordinaria de Prevención de Riesgos naturaleza del tipo de investigación, los materiales utilizados y el entorno de trabajo son:

- **Artículo 16** *“Plan de prevención de riesgos laborales, evaluación de los riesgos y planificación de la actividad preventiva”*

Modificado por LEY 54/2003

1. La prevención de riesgos laborales deberá integrarse en el sistema general de gestión de la empresa, tanto en el conjunto de sus actividades como en todos los niveles jerárquicos de ésta, a través de la implantación y aplicación de un plan de prevención de riesgos laborales a que se refiere el párrafo siguiente. Este plan de prevención de riesgos laborales deberá incluir la estructura organizativa, las responsabilidades, las funciones, las prácticas, los procedimientos, los procesos y los recursos necesarios para realizar la acción de prevención de riesgos en la empresa, en los términos que

reglamentariamente se establezcan.

Modificado por LEY 54/2003

2. Los instrumentos esenciales para la gestión y aplicación del plan de prevención de riesgos, que podrán ser llevados a cabo por fases de forma programada, son la evaluación de riesgos laborales y la planificación de la actividad preventiva a que se refieren los párrafos siguientes:

- a. El empresario deberá realizar una evaluación inicial de los riesgos para la seguridad y salud de los trabajadores, teniendo en cuenta, con carácter general, la naturaleza de la actividad, las características de los puestos de trabajo existentes y de los trabajadores que deban desempeñarlos. Igual evaluación deberá hacerse con ocasión de la elección de los equipos de trabajo, de las sustancias o preparados químicos y del acondicionamiento de los lugares de trabajo. La evaluación inicial tendrá en cuenta aquellas otras actuaciones que deban desarrollarse de conformidad con lo dispuesto en la normativa sobre protección de riesgos específicos y actividades de especial peligrosidad. La evaluación será actualizada cuando cambien las condiciones de trabajo y, en todo caso, se someterá a consideración y se revisará, si fuera necesario, con ocasión de los daños para la salud que se hayan producido.

Quando el resultado de la evaluación lo hiciera necesario, el empresario realizará controles periódicos de las condiciones de trabajo y de la actividad de los trabajadores en la prestación de sus servicios, para detectar situaciones potencialmente peligrosas.

- b. Si los resultados de la evaluación prevista en el párrafo a) pusieran de manifiesto situaciones de riesgo, el empresario realizará aquellas actividades preventivas necesarias para eliminar o reducir y controlar tales riesgos. Dichas actividades serán objeto de planificación por el empresario, incluyendo para cada actividad preventiva el plazo para llevarla a cabo, la designación de responsables y los recursos humanos y materiales necesarios para su ejecución.

El empresario deberá asegurarse de la efectiva ejecución de las actividades preventivas incluidas en la planificación, efectuando para ello un seguimiento continuo de la misma.

Las actividades de prevención deberán ser modificadas cuando se aprecie por el empresario, como consecuencia de los controles periódicos previstos en el párrafo a) anterior, su inadecuación a los fines de protección requeridos.

Añadido por LEY 25/2009.

- 2bis. Las empresas, en atención al número de trabajadores y a la naturaleza y peligrosidad de las actividades realizadas, podrán realizar el plan de prevención de riesgos laborales, la evaluación de riesgos y la planificación de la actividad preventiva de forma simplificada, siempre que ello no suponga

una reducción del nivel de protección de la seguridad y salud de los trabajadores y en los términos que reglamentariamente se determinen.

3. Cuando se haya producido un daño para la salud de los trabajadores o cuando, con ocasión de la vigilancia de la salud prevista en el artículo 22, aparezcan indicios de que las medidas de prevención resultan insuficientes, el empresario llevará a cabo una investigación al respecto, a fin de detectar las causas de estos hechos.

- **Artículo 17** *“Equipos de trabajo y protección”*

1. El empresario adoptará las medidas necesarias con el fin de que los equipos de trabajo sean adecuados para el trabajo que deba realizarse y convenientemente adaptados a tal efecto, de forma que garanticen la seguridad y la salud de los trabajadores al utilizarlos. Cuando la utilización de un equipo de trabajo pueda presentar un riesgo específico para la seguridad y la salud de los trabajadores, el empresario adoptará las medidas necesarias con el fin de que:
 - a. La utilización del equipo de trabajo quede reservada a los encargados de dicha utilización.
 - b. Los trabajos de reparación, transformación, mantenimiento o conservación sean realizados por los trabajadores específicamente capacitados para ello.
2. El empresario deberá proporcionar a sus trabajadores equipos de protección individual adecuados para el desempeño de sus funciones y velar por el uso efectivo de los mismos cuando, sean necesarios. Los equipos de protección individual deberán utilizarse cuando los riesgos no se puedan evitar o no puedan limitarse suficientemente por medios técnicos de protección colectiva o mediante medidas, métodos o procedimientos de organización del trabajo.

- **Artículo 18** *“Información consulta y participación de los trabajadores”*

1. A fin de dar cumplimiento al deber de protección establecido en la presente Ley, el empresario adoptará las medidas adecuadas para que los trabajadores reciban todas las informaciones necesarias en relación con:
 - a. Los riesgos para la seguridad y la salud de los trabajadores en el trabajo, tanto aquellos que afecten a la empresa en su conjunto como a cada tipo de puesto de trabajo o función.
 - b. Las medidas y actividades de protección y prevención aplicables a los riesgos señalados en el apartado anterior.
 - c. Las medidas adoptadas de conformidad con lo dispuesto en el artículo 20 de la presente Ley.

En las empresas que cuenten con representantes de los trabajadores, la información a que se refiere el presente apartado se facilitará por el empresario a los trabajadores a través de dichos representantes; no obstante, deberá informarse directamente a cada trabajador de los riesgos específicos que afecten a su puesto de trabajo o función y de las medidas de protección y prevención aplicables a dichos riesgos.

2. El empresario deberá consultar a los trabajadores, y permitir su participación, en el marco de todas las cuestiones que afecten a la seguridad y a la salud en el trabajo, de conformidad con lo dispuesto en el capítulo V de la presente Ley. Los trabajadores tendrán derecho a efectuar propuestas al empresario, así como a los órganos de participación y presentación previstos en el capítulo V de esta Ley, dirigidas a la mejora de los niveles de protección de la seguridad y la salud en la empresa.

- **Artículo 19** *“Formación de los trabajadores”*

1. En cumplimiento del deber de protección, el empresario deberá garantizar que cada trabajador reciba una formación teórica y práctica, suficiente y adecuada, en materia preventiva, tanto en el momento de su contratación, cualquiera que sea la modalidad o duración de ésta, como cuando se produzcan cambios en las funciones que desempeñe o se introduzcan nuevas tecnologías o cambios en los equipos de trabajo. La formación deberá estar centrada específicamente en el puesto de trabajo o función de cada trabajador, adaptarse a la evolución de los riesgos y a la aparición de otros nuevos y repetirse periódicamente, si fuera necesario.
2. La formación a que se refiere el apartado anterior deberá impartirse, siempre que sea posible, dentro de la jornada de trabajo o, en su defecto, en otras horas pero con el descuento en aquélla del tiempo invertido en la misma. La formación se podrá impartir por la empresa mediante medios propios o concertándola con servicios ajenos, y su coste no recaerá en ningún caso sobre los trabajadores.

- **Artículo 20** *“Medidas de emergencia”*

El empresario, teniendo en cuenta el tamaño y la actividad de la empresa, así como la posible presencia de personas ajenas a la misma, deberá analizar las posibles situaciones de emergencia y adoptar las medidas necesarias en materia de primeros auxilios, lucha contra incendios y evacuación de los trabajadores, designando para ello al personal encargado de poner en práctica estas medidas y comprobando periódicamente, en su caso, su correcto funcionamiento. El citado personal deberá poseer la formación necesaria, ser suficiente en número y disponer del material adecuado, en función de las circunstancias antes señaladas.

Para la aplicación de las medidas adoptadas, el empresario deberá organizar las relaciones que sean necesarias con servicios externos a la empresa, en particular en materia de primeros auxilios, asistencia médica de urgencia, salvamento y lucha contra incendios, de forma que quede garantizada la rapidez y eficacia de las mismas.

9.2 PLIEGO DE ESPECIFICACIONES TÉCNICAS

9.2.1 FICHAS DE SEGURIDAD DE LOS REACTIVOS

Para la obtención de las fichas de seguridad de los reactivos, se ha buscado la información proporcionada por los proveedores, donde vienen dadas tanto la nomenclatura del material como las características, propiedades y recomendaciones de seguridad que hay que tener siempre presente a la hora de trabajar con ellos.

9.2.1.1 NITRÓGENO LÍQUIDO

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O PREPARADO Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA

- Nombre comercial: Nitrógeno líquido
- Número de la ficha de datos de seguridad: 089B-1
- Uso: Varios
- Fórmula química: N₂
- Identificación de la compañía: Al Air Liquide España S.A., Pº de la Castellana, 35 28046 Madrid (España)
- Número de teléfono de emergencia: 915029300

2. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

- Sustancia/Mezcla: Sustancia
- Nombre del componente: Nitrógeno (líquido)
- Contenido: 100%
- Número de CAS: 7727-37-9
- Número CE: 231-783-9

No contiene otros componentes o impurezas que puedan influir en la clasificación del producto.

3. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

- Identificación de riesgos: Gas licuado fuertemente refrigerado. El contacto con el producto puede producir quemaduras por frío o congelación. Puede causar asfixia en altas concentraciones.
- Primeras vías de exposición: En condiciones normales ninguno.

4. PRIMEROS AUXILIOS

- *Inhalación: A elevadas concentraciones puede causar asfixia. Los síntomas pueden incluir la pérdida de la consciencia o de la movilidad. La víctima puede no haberse dado cuenta de la asfixia.*

- Retirar a la víctima a un área no contaminada llevando colocado el equipo de respiración autónoma. Mantener a la víctima caliente y en reposo. Llamar al doctor.
- *Aplicar la respiración artificial si se para la respiración.*
- Contacto con la piel y con los ojos: Lavar inmediatamente los ojos con agua durante, al menos, 15 minutos.
- En caso de congelación rociar con agua durante 15 minutos. Aplicar un vendaje estéril. Obtener asistencia médica.
- La ingestión no está considerada como una vía potencial de exposición.

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

- Tipo de inflamabilidad: No inflamable.
- Riesgos específicos: La exposición al fuego puede causar la rotura o explosión de los recipientes.
- Productos peligrosos de la combustión: Ninguno.
- Medios para extinguir incendios: Se pueden utilizar todos los extintores conocidos.
- Métodos específicos: Si es posible detener la fuga de producto. Colocarse lejos del recipiente y enfriarlo con agua desde un recinto protegido. Si fuga no rociar agua sobre el recipiente. Utilizar el agua para contener el fuego en el área circundante, desde un lugar protegido.
- Equipo de protección especial para la actuación en incendios: En espacios confinados utilizar equipos de respiración autónoma de presión positiva.

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

- Precauciones personales: Evacuar el área. Usar ropa de protección. Utilizar equipos de respiración autónoma cuando entren en el área a menos que esté probado que la atmósfera es segura. Asegurar la adecuada ventilación de aire.
- Precauciones para la protección del medio ambiente: Intentar parar el escape/derrame. Prevenir la entrada en alcantarillas, sótanos, fosos de trabajo o en cualquier lugar donde la acumulación pueda ser peligrosa.
- Métodos de limpieza: Ventilar la zona.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- Almacenamiento: Mantener el contenedor por debajo de 50°C, en un lugar bien ventilado.
- Manipulación: Debe prevenirse la filtración de agua al interior del recipiente. No permitir el retroceso hacia el interior del recipiente. Utilizar solo equipo específicamente apropiado para este producto y para su presión y temperatura de suministro, en caso de duda contacte con su suministrador. Solicitar del suministrador las instrucciones de manipulación de los contenedores.

8. CONTROLES DE LA EXPOSICIÓN / PROTECCIÓN PERSONAL

- Protección personal: Asegurar una ventilación adecuada. Proteger los ojos, cara y piel de las salpicaduras de líquido.
- Protección de las vías respiratorias: Equipo respiratorio indicado.
- Protección de las manos: Utilizar guantes de neopreno.
- Protección para la piel: Úsese indumentaria protectora adecuada.
- Protección para los ojos: Gafas químicas i pantalla de mano con gafas de seguridad.

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

- Estado físico a 20 °C: Gas licuado fuertemente refrigerado.
- Color: Líquido incoloro.
- Olor: Sin olor que advierta sus propiedades.
- Masa molecular: 28
- Punto de fusión (°C): -210 °C
- Punto de ebullición (°C): -196°C
- Temperatura crítica (°C): -147 °C
- Presión de vapor, 20 °C: Inaplicable.
- Densidad relativa del gas (aire=1): 0.97
- Densidad relativa del líquido (agua=1): 0.8
- Solubilidad en agua (mg/l): 20
- Otros datos: El vapor es más pesado que el aire. Puede acumularse en espacios confinados, particularmente al nivel del suelo o en sótanos.

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

- Estabilidad y reactividad: Estable en condiciones normales. Las fugas de líquido pueden producir fragilidad en materiales estructurales.
- Productos de descomposición peligrosos: No conocido.
- Materiales a evitar: Acero.

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

- Información sobre toxicidad: No se conocen los efectos toxicológicos de este producto.
- Dermal: No hay efecto conocido debido a una exposición crónica a este producto en condiciones normales de uso.
- Ocular: No hay efecto conocido debido a una exposición crónica a este producto en condiciones normales de uso.
- Ingestión: No hay efecto conocido debido a una exposición crónica a este producto en condiciones normales de uso.

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

- Información sobre efectos ecológicos: Puede causar hielo que dañe a la vegetación.

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

- General: No descargar dentro de ningún lugar donde su acumulación pudiera ser peligrosa. Contactar con el suministrador si se necesita orientación.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

- No UN: 1977
- H.I. nº: 22

ADR/RID

- Nombre propio para el transporte: UN1977 NITRÓGENO LÍQUIDO REFRIGERADO (Nitrógeno (Líquido)), 22, 3A
- ADR Clase: 2
- Código de clasificación ADR/RID: 3 A
- Grupo de embalaje ADR: A
- Etiquetado según ADR: Etiqueta 2.2: Gas no inflamable, no tóxico.

Otras informaciones para el transporte:

- Evitar el transporte en los vehículos donde el espacio de la carga no esté separado del compartimento del conductor.
- Asegurar que el conductor está enterado de los riesgos potenciales de la carga y que conoce que hacer en caso de un accidente o de una emergencia.
- Antes de transportar las botellas: Asegúrese de que los recipientes están bien fijados.
- Asegurarse que las válvulas de las botellas están cerradas y no fugan.
- Asegurarse que el tapón del acoplamiento de la válvula (cuando exista) está adecuadamente apretado.
- Asegurarse que la caperuza de la válvula o la tulipa, (cuando exista), está adecuadamente apretada.
- Asegurar una ventilación adecuada.
- Asegurarse de cumplir con la legislación aplicable.

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

Clasificación CE:

- No incluido en el anexo I.
- No clasificada como mezcla peligrosa.

Etiquetado CE: No requiere etiquetado CE.

- Símbolo(s): Ninguno.
- Frase(s) R: Ninguno.
- Frase(s) S: Ninguno.

16. OTRA INFORMACIÓN

Puede causar congelación.

Consérvese el recipiente en lugar bien ventilado. No respirar los gases.

Asegúrese que se cumplen las normativas nacionales y locales. Asfixiante a altas concentraciones.

El riesgo de asfixia es a menudo despreciado y debe ser recalcado durante la formación de los operarios.

La presente Ficha de Datos de Seguridad está establecida de acuerdo con las Directivas Europeas en vigor y se aplica a todos los países que han transpuesto las Directivas en su derecho nacional.

Antes de utilizar el producto en un nuevo proceso o experimento, debe llevarse a cabo un estudio completo de seguridad y de compatibilidad de los materiales. Los detalles dados son ciertos y correctos en el momento de llevarse este documento a impresión. A pesar de que durante la preparación de este documento se ha tomado especial cuidado, no se acepta ninguna responsabilidad por las lesiones o los daños resultantes.

9.2.1.2 ETANOL

Ficha de datos de seguridad según 1907/2006/CE, Artículo 31 (REACH)

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA

- ***Identificador del producto***

- Nombre comercial: Etanol absoluto, para síntesis
- Número del artículo: ET0002
- Número de CAS: 64-17-5
- Número CE: 200-578-6
- Número de clasificación: 603-002-00-5
- Número de registro: 01-2119457610-43-XXXX
- Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconejados: No existen más datos relevantes disponibles
- Utilización del producto/ de la elaboración: Reactivo de laboratorio

- **Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad**

- Fabricante/distribuidor: Scharlab, S.L.
C/Gato Pérez, 33. Pol. Ind. Mas d'en Cisa 08181 Sentment (Barcelona)
SPAIN
Tel: (+34) 93 745 64 00. FAX: (+34) 93 715 27 65
Email: scharlab@scharlab.com
Internet Web Site: www.scharlab.com

- **Área de información:** Departamento técnico

- **Teléfono de emergencia:** Scharlab, S.L. (+34) 93 715 18 11

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

- **Clasificación de la sustancia o de la mezcla**

- Clasificación con arreglo al Reglamento (CE) nº 127/2008



GHS02 llama

Flam. Liq. 2 H225 Líquido y vapores muy inflamables

- Clasificación con arreglo a la Directiva 67/548/CEE o Directiva 1999/45/CE



F; Fácilmente inflamable

R11: Fácilmente inflamable.

- **Indicaciones adicionales sobre los riesgos para personas y el medio ambiente:** Nulo.

- **Elementos de la etiqueta**

- Etiquetado con arreglo al Reglamento (CE) nº 127/2008
La sustancia se ha clasificado y etiquetado de conformidad con el reglamento CLP.
- Pictogramas de peligro



GHS02 llama

- **Palabra de advertencia:** Peligro

- **Indicaciones de peligro**

H225 Líquido y vapores muy inflamables.

- **Consejos de prudencia**

P210 Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llama abierta o superficies calientes. –No fumar.

P241 Utilizar un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/antideflagrante.

P280 Llevar guantes/prendas/gafas/máscara de protección.

P240 Conectar a tierra/enlace equipotencial del recipiente y del equipo de recepción

P303+P361+P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo):

Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.

P501 Eliminar el contenido o el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.

- **Otros peligros**
- **Resultados de la valoración PBT y mPmB**
 - PBT: No aplicable.
 - mPmB: No aplicable.

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

- **Caracterización química:** Sustancias
- **Denominación N° CAS:** 64-17-5 etanol
- **Número(s) de identificación**
 - Número CE: 200-578-6
 - Número de clasificación: 603-002-00-5

4. PRIMEROS AUXILIOS

- **Descripción de los primeros auxilios**
 - En caso de inhalación del producto: Suministrar aire fresco. En caso de trastornos, consultar a un médico.
 - En caso de contacto con la piel: Por regla general, el producto no irrita la piel.
 - En caso de contacto con los ojos: Limpiar los ojos abiertos durante varios minutos con agua corriente.
 - En caso de ingestión: Consultar un médico si los trastornos persisten.
- **Indicaciones para el médico:**
 - Principales síntomas y efectos, agudos y retardados: No existen más datos relevantes disponibles.
- **Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente:** No existen más datos relevantes disponibles.

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

- **Medios de extinción**
 - Sustancias extintoras apropiadas:

- CO₂, polvo extintor o chorro de agua rociada. Combatir incendios mayores con chorro de agua.
- ***Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla:*** No existen más datos relevantes disponibles.
- ***Recomendación para el personal de lucha contra incendios***
- ***Equipo especial de protección:*** No se requieren medidas especiales.

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

- ***Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia***
 - Llevar puesto equipo de protección. Mantener alejadas las personas sin protección.
- ***Precauciones relativas al medio ambiente:*** Diluir con mucha agua.
 - Evitar que penetre en la canalización/aguas de superficie/agua subterráneas.
- ***Métodos y material de contención y de limpieza:***

Quitar con material absorbente (arena, kieselgur, aglutinante de ácidos, aglutinante universal, aserrín).
Asegurar suficiente ventilación.
- ***Referencia a otras secciones***

Ver capítulo 7 para mayor información sobre una manipulación segura.
Ver capítulo 8 para mayor información sobre el equipo personal de protección.
Para mayor información sobre cómo desechar el producto, ver capítulo 13.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- ***Manipulación:***
 - Precauciones para una manipulación segura: Si se manipulan correctamente, no se requieren medidas especiales.
 - Prevención de incendios y explosiones:
Mantener alejadas las fuentes de encendido: No fumar. Tomar medidas contra las cargas electrostáticas.
- ***Almacenamiento:***
 - Exigencias con respecto al almacén y los recipientes: Almacenar en un lugar fresco.

- Normas en caso de un almacenamiento conjunto: No es necesario.
- Indicaciones adicionales sobre las condiciones de almacenamiento:
Mantener el recipiente cerrado herméticamente.
Almacenarlo en envases bien cerrados en un lugar fresco y seco.
- Usos específicos finales: No existen más datos relevantes disponibles.

8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN/PROTECCIÓN INDIVIDUAL

- **Instrucciones adicionales para el acondicionamiento de instalaciones técnicas:** Sin datos adicionales, ver punto 7.

- **Parámetros de control**

- **Componentes con valores límite admisibles que deben controlarse en el puesto de trabajo:** 64-17-5 etanol

LEP () Valor de corta duración: 1910 mg/m³, 1000 ppm

- **Indicaciones adicionales:** Como base se han utilizado las listas vigentes en el momento de la elaboración.

- **Controles de la exposición**

- Equipo de protección individual:
- Medidas generales de protección e higiene:
Lavarse las manos antes de las pausas y al final del trabajo.
- Protección respiratoria: No es necesario.
- Protección de manos: El material del guante deberá ser impermeable y resistente al producto / sustancia / preparado. Ante la ausencia de test específicos, no se puede recomendar ningún material específico para guantes de protección contra el producto / preparado / mezcla de sustancias químicas.
Selección del material de los guantes en función de los tiempos de rotura, grado de permeabilidad y degradación.
- Material de los guantes
La elección del guante adecuado no depende únicamente del material, sino también de otras características de calidad, que pueden variar de un fabricante a otro.
- Tiempo de penetración del material de los guantes
El tiempo de resistencia a la penetración exacto deberá ser pedido al fabricante de los guantes. Este tiempo debe ser respetado.
- Protección de ojos:



Gafas de protección herméticas

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

○ Información sobre propiedades físicas y químicas básicas

- **Datos generales**
 - Aspecto: Forma: Líquido Color: Incoloro
 - Olor: Similar al del alcohol
 - Umbral olfativo: No determinado.
 - Valor pH: No determinado.
- **Cambio de estado:**
Punto de fusión: -114.5 °C Punto de ebullición: 78 °C
- **Punto de inflamación:** 12 °C
- **Inflamabilidad (sólido, gaseiforme):** No aplicable.
- **Temperatura de agnición:** 425 °C.
- **Temperatura de descomposición:** No determinado.
- **Autoinflamabilidad:** No determinado.
- **Peligro de explosión:** El producto no es explosivo; sin embargo, pueden formarse mezclas explosivas de vapor/aire.
- **Límites de explosión:** Inferior: 3.5 vol % ; Superior: 15 vol%
- **Presión de vapor a 20 °C:** 59 hPa
- **Densidad a 20 °C:** 0.79 g/cm³
- **Densidad relativa:** No determinado.
- **Densidad de vapor:** No determinado.
- **Velocidad de evaporación:** No determinado.
- **Solubilidad en/ miscibilidad con agua a 20 °C:** 1 g/l
- **Coefficiente de reparto (n-octanol/agua):** No determinado.
- **Viscosidad:** Dinámica a 20°C: 1.2 mPas ; Cinemática: No determinado.
- **Información adicional:** No existen más datos relevantes disponibles.

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

- **Reactividad**
- **Estabilidad química**
- **Descomposición térmica/ condiciones que deben evitarse:** No se descompone al emplearse adecuadamente.
- **Posibilidad de reacciones peligrosas:** No se conocen reacciones peligrosas.
- **Condiciones que deben evitarse:** No existen más datos relevantes disponibles.
- **Materiales incompatibles:** No existen más datos relevantes disponibles.
- **Productos de descomposición peligrosos:** No se conocen productos de descomposición peligrosos.

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

○ **Información sobre los efectos toxicológicos**

- **Toxicidad aguda:**

- Valores LD/LC50 (dosis letal / dosis letal= 50%) relevantes para la clasificación:
Oral LD50 7060mg/kg (rata) ; Inhalatorio LC50/4 h 20000 mg/l (rata)

- **Efecto estimulante primario:**

- En la piel: No produce irritaciones.
- En el ojo: No produce irritaciones.
- Sensibilización: No se conoce ningún efecto sensibilizante.

12. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA AMBIENTAL

- **Toxicidad**

- Toxicidad acuática: No existen más datos relevantes disponibles
- Persistencia y degradabilidad: No existen más datos relevantes disponibles.

- **Comportamiento en sistemas ecológicos:**

- Potencial de bioacumulación: No existen más datos relevantes disponibles.
- Movilidad en el suelo: No existen más datos relevantes disponibles.

- **Indicaciones medioambientales adicionales:**

- Indicaciones generales:
Nivel de riesgo para el agua 1 (clasificación de listas): escasamente peligroso para el agua. En estado no diluido o no neutralizado, no dejar que se infiltre en aguas subterráneas, aguas superficiales o en alcantarillados.

- **Resultados de la valoración PBT y mPmB**

- PBT: No aplicable.
- mPmB: No aplicable.
- Otros efectos adversos: No existen más datos relevantes disponibles.

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

- **Métodos para el tratamiento de residuos**


- Recomendación: No debe desecharse con la basura doméstica. No debe llegar al alcantarillado.

- **Embalajes sin limpiar:**

- Recomendación: Eliminar conforme a las disposiciones oficiales.

- **Producto de limpieza recomendado:** Agua, eventualmente añadiendo productos de limpieza.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

- **Número UN**
- **ADR, IMDG, IATA** UN1170
- **Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas**
 - ADR 1170 ETANOL (ALCOHOL ETÍLICO)
 - IMDG ETHANOL (ETHYL ALCOHOL)
 - IATA ETHANOL
 - Clase(s) de peligro para el transporte
- ADR 
- Clase 3 Líquidos inflamables
- Etiqueta 3
- Número Kemler: 33
- Número EMS: F-E, S-D
- Transporte a granel con arreglo al anexo II del Convenio Marpol 73/78 y del Código IBC: No aplicable.
- **Transporte/datos adicionales:**
 - ADR
 - Cantidades limitadas (LQ) 1L
 - Categoría de transporte 2
 - Código de restricción del túnel D/E
 - “Reglamentación Modelo” de la UNECE: UN1170, ETANOL (ALCOHOL ETÍLICO), 3, II

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

- Evaluación de la seguridad química: Una evaluación de la seguridad química no se ha llevado a cabo.

9.2.1.3 POLIÁCIDO-L-LÁCTICO (PLLA)

Ficha de datos de seguridad de acuerdo con 29 CFR 910.1200, ANSI Z400.1-2004, y ISO 11014-1:1994.

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O LA MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA

- **Identificadores del producto**
 - Nombre del producto :Biopolímero Ingeo TM ; Referencia: 4042D
 - Uso del producto: Puede ser usado para termoconformado, inyección en molde, revestimientos, moldeado por soplado y aplicaciones de fibra.

- Proveedor: NatureWorks LLC, 15305 Minnetonka Blvd, Minnetonka, MN 55345 USA
Centro de Información al Cliente: 800-664-6436
madsinquiry@natureworkslc.com
- Teléfonos de emergencia (24 horas al día):
Información médica (651) 632-9273
Información sobre el transporte CHEMTREC: 800-424-9300 (en EEUU)
Información sobre el transporte CHEMTREC: (703) 527-3887 (fuera de EEUU)

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

• Visión general de emergencia:

PRECAUCIÓN: Puede causar irritación de los ojos/piel. La combustión produce humos nocivos y tóxicos. Evitar el contacto con la piel y los ojos. Evitar la formación de polvo y aerosoles.

- Aspecto: Claro, translúcido, opaco, pellets.
- Color: Transparente, translúcido, opaco.
- Estado físico: Sólido.
- Olor: Dulce.

• Efectos potenciales sobre la salud:

- Contacto con ojos: El contacto con los ojos puede causar irritación.
- Contacto con la piel: La sustancia puede provocar una ligera irritación de la piel.
- Ingestión: La ingestión puede causar irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos y diarrea.
- Inhalación: La inhalación de polvo puede causar dificultad para respirar, opresión en el pecho, dolor de garganta y tos. Bajo riesgo para manejo industrial o comercial normal.
- Efectos sobre los órganos: No se observaron efectos en los órganos después de la ingestión o exposición dérmica en estudios con animales.
- Sensibilización: No produce sensibilización en animales de laboratorio
- Peligros específicos: No hay información disponible.
- Fuego: Polvo fino disperso en el aire puede encenderse.
- Precauciones ambientales: No determinado. Ver sección 12 para más información.

Clasificación NFPA			
Salud: 1	Flamm: 1	Reactividad: 0	Especial: No determinado
Clasificación HMIS			
Salud: 1	Flamm: 1	Reactividad: 0	EPI's: No determinado

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

- Identificación: Resina de polilactida 9051-89-2
- Peso %: >98
- Límites de exposición OSHA: Ninguno
- Límites de exposición ACGIH: Ninguno
Todos los ingredientes en cantidades >1.0% (0.1% para los carcinógenos) que son potencialmente peligrosos por las definiciones de OSHA.
- Otras normas: Este material puede generar partículas no clasificables (PNOC) La Administración de Seguridad y Salud Ocupacional (OSHA) PEL/TWA para PNOC es 15 mg / m³ para polvo y 5 mg/ m³ para la fracción respirable.

4. PRIMEROS AUXILIOS

- **Teléfonos de emergencia (24 horas al día):**
 Información médica (651) 632-9273
 Información sobre el transporte CHEMTREC: 800-424-9300 (en EEUU)
 Información sobre el transporte CHEMTREC: (703) 527-3887 (fuera de EEUU)
- **Contacto con los ojos:** Enjuagar inmediatamente con abundante agua, también debajo de los párpados, por lo menos, 15 min. Llame inmediatamente al médico.
- **Contacto con la piel:** Lavar inmediatamente con abundante agua durante al menos 15 minutos. Si persiste la irritación en la piel, llame a un médico. Refrescar la piel rápidamente con agua fría después del contacto con el polímero caliente.
- **Inhalación:** Salir al aire libre. Llame inmediatamente al médico.
- **Ingestión:** Beber agua como medida de precaución. No dar nada por la boca a una persona inconsciente. No provocar vómitos sin consejo médico. Llame inmediatamente al médico.
- **Notas para el médico:** Tratar sintomáticamente.

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

- **Inflamabilidad:**
 - Temperatura de autoignición: 388 °C
- **Límites de inflamabilidad en aire:**
 - Límites de inflamabilidad en aire – inferior (%): No aplicable.
 - Límites de inflamabilidad en aire – superior (%): No aplicable.
- **Medios de extinción adecuados:** Espuma. Agua. Dióxido de carbono (CO₂). Producto químico seco. Espumas resistentes al alcohol son preferibles si están disponibles. De propósito general espumas sintéticas (incluyendo AFFF) o espumas de proteínas pueden funcionar, pero de manera mucho menos eficaz.
- **Medios de extinción que no deben utilizarse por razones de seguridad:** No hay información disponible.
- **Productos de descomposición peligrosos:** La combustión produce humos nocivos y tóxicos, aldehídos, monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂).
- **Equipo de protección especial para los bomberos:** Como en cualquier incendio, llevar autónomo equipo de respiración con demanda de presión, MSHA / NIOSH (aprobado o equivalente) y equipo completo de protección.
- **Bajo condiciones de incendio:** Enfríe los recipientes / tanques con pulverización por agua. Vapor de agua puede ser usado para enfriar los contenedores cerrados.
- **Información adicional:** El polvo fino disperso en el aire puede encenderse. Los riesgos de ignición seguidos de propagación de la llama o de explosiones secundarias se pueden prevenir evitando la acumulación de polvo, por ejemplo, en pisos y repisas.

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

- Precauciones personales: Utilícese equipo de protección personal. Ver Sección 8. Elimine todas las fuentes de ignición. Evitar la formación de polvo. Evite el contacto con la piel y los ojos. Barrer para prevenir el riesgo de resbalones.
- Precauciones ambientales: No echar al agua superficial o al sistema de alcantarillado sanitario. No permita que el material contamine el agua del subsuelo.
- Métodos de limpieza: Recoger en un contenedor apropiado para su eliminación.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- **Precauciones para una manipulación segura**
 - Evítese el contacto con los ojos y la piel. Evitar formación de neblina. Los trabajadores deben ser protegidos de la posibilidad de entrar en contacto con el material fundido durante la manipulación. Bajo riesgo para manejo industrial o comercial normal. Usar equipo de protección personal. Vea la Sección 8.
- **Almacenamiento**
 - Conservar en lugar fresco. Mantener a temperaturas inferior a (50°C).

- No hay restricciones en almacenamiento con otros productos.
- Precauciones: No requiere precauciones especiales.

8. *CONTROLES DE EXPOSICIÓN/PROTECCIÓN INDIVIDUAL*

- Disposiciones de ingeniería: Donde sea razonablemente practicable, esto debe lograrse mediante el uso ventilación local y una buena extracción general.
- Debe disponer de extracción adecuada en aquellos lugares donde se forma polvo.
- Parámetros de control: Ninguno
- Equipo de protección individual:
 - Protección de ojos: Gafas protectoras con cubiertas laterales.
 - Protección piel y cuerpo: Indumentaria impermeable.
 - Protección respiratoria: Se debe usar mascarilla si se expone al polvo. Se necesita protección respiratoria si alguno de los límites de exposición de la Sección 2 se superan. Consulta a un profesional de higiene industrial antes de la selección del respirados a utilizar.
 - ADVERTENCIA: Los respiradores purificadores de aire no protegen a los trabajadores en atmósferas deficientes de oxígeno.
 - Protección de las manos: Protección preventiva de la piel.
 - Medidas de higiene: Evitar el contacto con la piel, ojos y ropa.
- Límites de exposición: Ver la Sección 3.

9. *PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS*

• ***Información sobre propiedades físicas y químicas básicas***

- Aspecto: Claro, translúcido, opaco, pellets.
- Color: Claro, translúcido, opaco.
- Estado físico: Sólido.
- Olor: Dulce.
- pH: No aplicable
- Presión de vapor: Sin determinar
- Densidad de vapor: Sin determinar
- Tasa de evaporación: No determinado
- Densidad: 1.24 g/ cc
- Punto de ebullición/rango: No aplicable.
- Temperatura de descomposición: 250 °C
- Temperatura de fusión/rango: indeterminado
- Solubilidad en agua: Insoluble
- Solubilidad en otros disolventes: No se conocen.

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

- **Estabilidad química**
 - Estable bajo las condiciones de almacenamiento recomendadas.
- **Condiciones a evitar**

Temperaturas por encima de 230 °C
- **Material que deben evitarse**

Agentes oxidantes. Bases fuertes.
- **Productos de descomposición peligrosa**

La combustión produce humos nocivos y tóxicos, aldehídos, monóxido de carbono (CO), dióxido de carbono (CO₂).
- **Polimerización**

No aplicable

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

- Vías principales de exposición: Contacto con los ojos. Contacto con la piel. Inhalación. Ingestión.
- Toxicidad aguda: No hubo efectos en órganos diana después de la ingestión o absorción cutánea en estudios con animales.
- Efectos locales: Puede causar irritación de los ojos / piel. El polvo del producto puede ser irritante para los ojos, la piel y el sistema respiratorio. Puede causar una leve o moderada irritación conjuntival en irritación de los ojos (estudios usando conejos). Puede causar enrojecimiento muy leve. (estudios de irritación dérmica utilizando conejos).
- La ingestión puede causar irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos y diarrea.
- Toxicidad a largo plazo: No produce reacciones alérgicas en la piel en estudios de sensibilización de la piel usando conejillos de indias.
- Efectos específicos: Puede causar irritación y / o dermatitis. La ingestión puede causar irritación gastrointestinal, náuseas, vómitos y diarrea.
- La inhalación de polvo puede causar dificultad para respirar, opresión en el pecho, dolor de garganta y tos. La combustión produce vapores irritantes.
- Efectos mutagénicos: No es mutágeno en la prueba de AMES.
- Toxicidad para la reproducción: No hay datos disponibles sobre los mismos.
- Efectos carcinógenos: No hay datos disponibles sobre este producto.
- Efectos sobre los órganos: No hubo efectos en órganos diana después de la ingestión o exposición dérmica en estudios con animales.
- Piel: DL50 / dérmica / conejo > 2.000 mg / kg
- Ingestión: DL50 / oral / rata > 5000 mg / kg.

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

- Movilidad: No hay datos disponibles.
- Bioacumulación: No debe bioacumularse. Intrínsecamente biodegradable.

- Efectos ecotoxicológicos: CE50/ 72 h / algas>1100 mg / L

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

- **Métodos para el tratamiento de residuos**

- De conformidad con las regulaciones locales y nacionales.
- No contaminar los estanques, ríos o acequias con producto químico o envase usado. Contacte con el fabricante.
LA EMPRESA NO TIENE CONTROL SOBRE LAS PRÁCTICAS DE GESTIÓN NI LOS PROCESOS DE FABRICACIÓN DE PARTES QUE MANEJAN O USAN ESTE MATERIAL. LA INFORMACIÓN PRESENTADA EN ESTE DOCUMENTO SE REFIERE SOLAMENTE AL PRODUCTO ENVIADO EN LAS CONDICIONES PREVISTAS Y DESCRITAS EN MSDS SECCIÓN 2. (Composición / Información sobre los ingredientes).
- Envases contaminados: Vaciar el contenido restante. No vuelva a utilizar los envases vacíos. Los contenedores deben ser transportados para su vacío usando un portador de residuos registrado.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

- **Departamento de EE.UU. de Transporte (DOT):**

- Nombre propio del transporte: No está regulado como un material peligroso.

- **IMDG:**

- Nombre propio del transporte: Ninguno
- Clase de peligro: No está regulado.
- UN / ID .: Ninguno
- Grupo de embalaje: Ninguno

- **ICAO / IATA:**

- Nombre propio del transporte: Ninguno
- Clase de peligro: No está regulado.
- Grupo de embalaje: Ninguno

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

Requisitos reglamentarios están sujetos a cambio y pueden diferir de un lugar a otro. Es responsabilidad del comprador para asegurar que sus actividades cumplan con las regulaciones federales, estatales o leyes provinciales y locales. La siguiente información específica se hace con el propósito de cumplir con numerosas leyes federales, estatales o provinciales, y las leyes y reglamentos locales.

Ver otras secciones de información de salud y seguridad.

REGLAMENTOS EE.UU

Sara 313 del título III: No listado. TSCA Inventario: Listado

REGULACIONES ESTATALES

Propuesta de California 65: No Listado

INVENTARIOS INTERNACIONALES

Inventario Canadiense DSL: Listado

Lista UE EINECS: Los componentes están en cumplimiento y / o se enumeran. Japón (ECL): Listado

Australia (AICS): Listado

Inventario de sustancias químicas de Corea: Listado Filipinas (PICCS): No listado

Inventario existente de sustancias químicas de China: Listado.

16. OTRA INFORMACIÓN

Información en la etiqueta: Biopolímero Ingeo™ Código de producto: 4042D

Razón de la revisión: No aplicable Fecha de revisión: 04/01/2010 Fecha: 05/24/2011

Restricciones recomendadas: Ninguno

Preparado por: NatureWorks LLC Salud y Seguridad

9.2.1.4 DIOXANO

Ficha de datos de seguridad según 1907/2006/CE, Artículo 31 (REACH)

1. IDENTIFICACIÓN DE LA SUSTANCIA O MEZCLA Y DE LA SOCIEDAD O LA EMPRESA

- ***Identificador del producto***

- Nombre comercial: 1,4 – Dioxano, purísimo, estabilizado con 2.5 ppm de 2.6–Di-terc-butil-4-metilfenol (BHT)
- Número del artículo: DI1287
- Número de CAS: 123-91-1
- Número CE: 204-661-8
- Usos pertinentes identificados de la sustancia o de la mezcla y usos desaconsejados: No existen más datos relevantes disponibles.
- Utilización del producto/ de la elaboración: Reactivo de laboratorio

- ***Datos del proveedor de la ficha de datos de seguridad***

- Fabricante/distribuidor: Scharlab, S.L.
C/Gato Pérez, 33. Pol. Ind. Mas d'en Cisa 08181 Sentment (Barcelona)
SPAIN
Tel: (+34) 93 745 64 00. FAX: (+34) 93 715 27 65
Email: scharlab@scharlab.com ; Internet Web Site: www.scharlab.com

- ***Área de información:*** Departamento técnico

- ***Teléfono de emergencia:*** Scharlab, S.L. (+34) 93 715 18 11

2. IDENTIFICACIÓN DE LOS PELIGROS

- **Clasificación de la sustancia o de la mezcla**

- Clasificación con arreglo al Reglamento (CE) nº 1272/2008



GHS02 llama

Flam. Liq. 2 H225 Líquido y vapores muy inflamables.



GHS08 peligro para la salud

Carc. 2 H351 Se sospecha que provoca cáncer



GHS07

Eye Irrit. 2 H319 Provoca irritación ocular grave.

STOT SE 3 H335 Puede irritar las vías respiratorias.

- **Clasificación con arreglo a la Directiva 67/548/CEE o Directiva 1999/45/CE**



Xn; Nocivo

R40: Posibles efectos cancerígenos.



Xi; Irritante

R36/37: Irrita los ojos y las vías respiratorias



F; Fácilmente inflamable

R11: Fácilmente inflamable.

R19-66: Puede formar peróxidos explosivos. La exposición repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel.

Carc. Cat. 3

- **Indicaciones adicionales sobre los riesgos para personas y el medio ambiente:** Debido al efecto desengrasante del disolvente, el contacto prolongado o repetido con la piel puede provocar una dermatitis (inflamación de la piel).

- **Elementos de la etiqueta**

- Etiquetado con arreglo al Reglamento (CE) nº1272/2008
La sustancia se ha clasificado y etiquetado de conformidad con el reglamento CLP
- Pictogramas de peligro:



- Palabra de advertencia: Peligro.
- Indicaciones de peligro
 - H225 Líquido y vapores muy inflamables.
 - H319 Provoca irritación ocular grave.
 - H351 Se sospecha que provoca cáncer.
 - H335 Puede irritar las vías respiratorias.

- **Consejos de prudencia**

P210 Mantener alejado de fuentes de calor, chispas, llama abierta o superficies calientes. –No fumar.

P241 Utilizar un material eléctrico, de ventilación o de iluminación/antideflagrante.

P303+P361+P353 EN CASO DE CONTACTO CON LA PIEL (o el pelo): Quitarse inmediatamente las prendas contaminadas. Aclararse la piel con agua o ducharse.

P305+P351+P338 EN CASO DE CONTACTO CON LOS OJOS: Aclarar cuidadosamente con agua durante varios minutos. Quitar las lentes de contacto, si lleva y resulta fácil. Seguir aclarando.

Guardar bajo llave.

Eliminar contenido o el recipiente conforme a la reglamentación local/regional/nacional/internacional.

- **Datos adicionales**

EUH019 Puede formar peróxidos explosivos.

EUH066 La explosión repetida puede provocar sequedad o formación de grietas en la piel.

- **Otros peligros**

- **Resultados de la valoración PBT y mPmB**

- PBT: No aplicable
- mPmB: No aplicable.

3. COMPOSICIÓN/INFORMACIÓN SOBRE LOS COMPONENTES

- **Caracterización química:** Sustancias
- **Denominación N° CAS:** 123-91-1 1.4-dioxano
- **Número(s) de identificación**
 - Número CE: 204-661-8
 - Número de clasificación: 603-024-00-5

4. PRIMEROS AUXILIOS

- **Descripción de los primeros auxilios**
 - En caso de inhalación del producto: Suministrar aire fresco. En caso de trastornos, consultar médico,
 - En caso de contacto con la piel: Por regla general, el producto no irrita la piel.
 - En caso de contacto con los ojos: Limpiar los ojos abiertos durante varios minutos con agua corriente.
 - En caso de ingestión: Consultar un médico si los trastornos persisten.
- **Indicaciones para el médico:**
 - Principales síntomas y efectos, agudos y retardados: No existen más datos relevantes disponibles.
- **Indicación de toda atención médica y de los tratamientos especiales que deban dispensarse inmediatamente:** No existen más datos relevantes disponibles.

5. MEDIDAS DE LUCHA CONTRA INCENDIOS

- **Medios de extinción**
 - Sustancias extintoras apropiadas:
 - CO₂, polvo extintor o chorro de agua rociada. Combatir incendios mayores con chorro de agua rociada o espuma resistente al alcohol.
- **Peligros específicos derivados de la sustancia o la mezcla:** No existen más datos relevantes disponibles.
- **Recomendación para el personal de lucha contra incendios**
- **Equipo especial de protección:** No se requieren medidas especiales.

6. MEDIDAS EN CASO DE VERTIDO ACCIDENTAL

- **Precauciones personales, equipo de protección y procedimientos de emergencia**

Llevar puesto equipo de protección. Mantener alejadas las personas sin protección.
- **Precauciones relativas al medio ambiente**

Diluir con mucha agua
Evitar que penetre en la canalización/agua de superficie/aguas subterráneas.
- **Métodos y material de contención y de limpieza**

Quitar con material absorbente (arena, kieselgur, aglutinante de ácidos, aglutinante universal, aserrín).

Desechar el material contaminado como vertido según ítem 13. Asegurar suficiente ventilación.

- **Referencia a otras secciones**

Ver capítulo 7 para mayor información sobre una manipulación segura. Ver capítulo 8 para mayor información sobre el equipo personal de protección.

Para mayor información sobre cómo desechar el producto, ver capítulo 13.

7. MANIPULACIÓN Y ALMACENAMIENTO

- **Manipulación:**

- Precauciones para una manipulación segura. Abrir y manejar el recipiente con cuidado.
- Prevención de incendios y explosiones: Mantener alejadas las fuentes de encendido. No fumar.
- Tomar medidas contra las cargas electrostáticas.
- Condiciones de almacenamiento seguro, incluidas posibles incompatibilidades.

- **Almacenamiento:**

- Exigencias con respecto al almacén y los recipientes: Almacenar en un lugar fresco.
- Normas en caso de un almacenamiento conjunto: No es necesario.
- Indicaciones adicionales sobre las condiciones de almacenamiento: Mantener el recipiente cerrado herméticamente. Almacenarlo en envases bien cerrados en un lugar fresco y seco.
- Usos específicos finales: No existen más datos relevantes disponibles.

8. CONTROLES DE EXPOSICIÓN/PROTECCIÓN INDIVIDUAL

- **Instrucciones adicionales para el acondicionamiento de instalaciones técnicas:** Sin datos adicionales, ver punto 7.

- **Parámetros de control**

- **Componentes con valores límite admisibles que deben controlarse en el puesto de trabajo:** 123-91-1 ; 1,4-dioxano ; LEP () Valor de larga duración: 73mg/m³, 20 ppm ; VLI

- **Indicaciones adicionales:** Como base se han utilizado las listas vigentes en el momento de la elaboración.

- **Controles de la exposición**

- Equipo de protección individual:
- Medidas generales de protección e higiene:
 - Mantener alejado de alimentos, bebidas y alimentos para animales.
 - Quitarse de inmediato la ropa ensuciada o impregnada.
 - Lavarse las manos antes de las pausas o impregnada. Evitar el contacto con los ojos.
 - Evitar el contacto con los ojos y la piel.
- Protección respiratoria: Si la exposición va a ser breve o de poca intensidad, colocarse una máscara respiratoria. Para una exposición más intensa o de mayor duración, usar un aparato de respiración autónomo.

- Protección de manos:



Guantes de protección

El material del guante deberá ser impermeable y resistente al producto/ sustancia / preparado. Ante la ausencia de test específicos, no se puede recomendar ningún material específico para guantes de protección contra el producto / preparado / mezcla de sustancias químicas.

Selección del material de los guantes en función de los tiempos de rotura, grado de permeabilidad y degradación.

- Material de los guantes
La elección del guante adecuado no depende únicamente del material, sino también de otras características de calidad, que pueden variar de un fabricante a otro.
- Tiempo de penetración del material de los guantes
El tiempo de resistencia a la penetración exacto deberá ser pedido al fabricante de los guantes. Este tiempo debe ser respetado.
- Protección de ojos:



Gafas de protección herméticas

9. PROPIEDADES FÍSICAS Y QUÍMICAS

- **Información sobre propiedades físicas y químicas básicas**
- **Datos generales**
 - Aspecto: Forma: Líquido Color: Incoloro
 - Olor: Etéreo.
 - Umbral olfativo: No determinado.
 - Valor pH: No determinado.
- **Cambio de estado:**
Punto de fusión: 11.8 °C
Punto de ebullición: 101.3 °C
- **Punto de inflamación:** 11 °C
- **Inflamabilidad (sólido, gaseiforme):** No aplicable.
- **Temperatura de ignición:** 375 °C.
- **Temperatura de descomposición:** No determinado.
- **Autoinflamabilidad:** No determinado.
- **Peligro de explosión:** Puede formar peróxidos explosivos
- **Límites de explosión:** Inferior: 1.9 vol% ; Superior: 22.5 vol %.
- **Presión de vapor a 136°C:** 41 hPa

- **Densidad a 20 °C:** 1.0336 g/cm³
- **Densidad relativa:** No determinado.
- **Densidad de vapor:** No determinado.
- **Velocidad de evaporación:** No determinado.
- **Solubilidad en/ miscibilidad con agua a 20 °C:** Completamente mezclable.
- **Coeficiente de reparto (n-octanol/agua):** No determinado.
- **Viscosidad:** Dinámica a 25°C: 1.2 mPas ; Cinemática: No determinado.
- **Información adicional:** No existen más datos relevantes disponibles.

10. ESTABILIDAD Y REACTIVIDAD

- **Reactividad**
- **Estabilidad química**
- **Descomposición térmica/ condiciones que deben evitarse:** No se descompone al emplearse adecuadamente.
- **Posibilidad de reacciones peligrosas.** No se conocen reacciones peligrosas
- **Condiciones que deben evitarse** No existen más datos relevantes disponibles.
- **Materiales incompatibles:** No existen más datos relevantes disponibles.
- **Productos de descomposición peligrosos:** No se conocen productos de descomposición peligrosos.

11. INFORMACIÓN TOXICOLÓGICA

- **Información sobre los efectos toxicológicos**
- **Toxicidad aguda:**
 - Valores LD/LC50 (dosis letal / dosis letal= 50%) relevantes para la clasificación:
Oral (LD50) 5700mg/kg (ratón)
Dermal (LD50) 7600 mg/kg (conejo)
Inhalatorio (LC50/4 h) 46 mg/l (rata)
- **Efecto estimulante primario:**
 - En la piel: No produce irritaciones.
 - En el ojo: Produce irritaciones.
 - Sensibilización: No se conoce ningún efecto sensibilizante.
 - Efectos CMR (carcinogenicidad, mutagenicidad y toxicidad para la reproducción)

12. INFORMACIÓN ECOLÓGICA

- **Toxicidad**
 - Toxicidad acuática: No existen más datos relevantes disponibles.
 - Persistencia y degradabilidad: No existen más datos relevantes disponibles.
- **Comportamiento en sistemas ecológicos:**
 - Potencial de bioacumulación: No existen más datos relevantes disponibles.
 - Movilidad en el suelo: No existen más datos relevantes disponibles.
- **Indicaciones medioambientales adicionales:**

- Indicaciones generales:
Nivel de riesgo para el agua 2 (autoclasiicación): peligroso para el agua. No dejar que se infiltre en aguas subterráneas, aguas superficiales o alcantarillados. Una cantidad mínima vertida en el subsuelo ya representa un peligro para el agua potable.
- **Resultados de la valoración PBT y mPmB**
 - PBT: No aplicable.
 - mPmB: No aplicable.
 - Otros efectos adversos: No existen más datos relevantes disponibles.

13. CONSIDERACIONES RELATIVAS A LA ELIMINACIÓN

- **Métodos para el tratamiento de residuos**
 - Recomendación: No debe desecharse con la basura doméstica. No debe llegar al alcantarillado.
- **Embalajes sin limpiar:**
 - Recomendación: Eliminar conforme a las disposiciones oficiales.
 - Producto de limpieza recomendado: Agua, eventualmente añadiendo productos de limpieza.

14. INFORMACIÓN RELATIVA AL TRANSPORTE

- **Número UN**
- **ADR, IMDG, IATA UN1165**
- **Designación oficial de transporte de las Naciones Unidas**
 - ADR 1165 DIOXANO
 - IMDG, IATA DIOXANE
 - Clase(s) de peligro para el transporte

- ADR



- Clase 3 Líquidos inflamables
- Etiqueta 3
- ADR, IMDG, IATA II
- **Peligros para el medio ambiente:**
 - Contaminante marino: No
 - Precauciones particulares para los usuarios Atención: Líquidos inflamables.
 - Número Kemler: 33
 - Número EMS: F-E, S-D
 - Transporte a granel con arreglo al anexo II del Convenio Marpol 73/78 y

del Código IBC: No aplicable.

- ***Transporte/datos adicionales:***

- *ADR*
- *Cantidades limitadas (LQ) 1L*
- *Categoría de transporte 2*
- *Código de restricción del túnel D/E*
- *“Reglamentación Modelo” de la UNECE: UN1165, DIOXANO,3, II*

15. INFORMACIÓN REGLAMENTARIA

- Evaluación de la seguridad química: Una evaluación de la seguridad química no se ha llevado a cabo.

9.2.2 ESPECIFICACIONES TÉCNICAS DE LOS EQUIPOS

Para poder llevar a cabo el proyecto, han sido necesarios muchos aparatos que han facilitado y permitido desarrollar todos los análisis necesarios para la caracterización de las muestras.

Todos los equipos cumplen con lo necesario en cuanto a su fabricación y ensayos, según la última edición de la norma UNE, publicada por AENOR, referente a cada elemento o material que se especifica. Como no hay una norma UNE para un equipo concreto, se aplica la norma europea más restrictiva.

En las tablas de a continuación, se muestran las especificaciones técnicas de cada instrumento:

9.2.2.1 Máquina universal de ensayos mecánicos



Tabla de especificaciones 1 Máquina universal de ensayos mecánicos

MODELO	Microtest EM1/50
CAPACIDAD (kN)	50
RECORRIDO HUSILLO (mm)	100
ACCIONAMIENTO	Sistema electromecánico: Husillo a bolas accionado por sistema motorreductor
REGULACIÓN	Regulación motor de continua: Señal de mando ± 10 V
RANGO DE VELOCIDADES (mm/min)	0-100
RESOLUCIÓN FUERZA (kN)	0,001
RESOLUCIÓN POSICIÓN (mm)	0,001
DIMENSIONES (mm)	654x245x1275

9.2.2.2 Agitador magnético con calefacción



Tabla de especificaciones 2 Agitador magnético con calefacción

MODELO	Ovan – Multimix D 5p (MMH50E)
REFERENCIA	10000-01037
Nº DE PLAZAS	5
<i>Agitación magnética</i>	
VOLUMEN MÁX. (L) (POR PLAZA)	2
POTENCIA (W) (POR PLAZA)	9
RANGO DE VELOCIDAD (RPM)	200-1200
RESOLUCIÓN (RPM)	100
<i>Calefacción</i>	
POTENCIA CALEFACTORA (W) POR PLAZA	250
RANGO DE TEMPERATURA (°C)	30-400
RESOLUCIÓN (°C)	10
<i>Datos generales</i>	
MATERIAL PLATO	Aluminio pulido
DIMENSIONES PLATO (mm) (POR PLAZA)	100x100
DIMENSIONES (mm)	360x445x90
PESO	6
PROTECCIÓN IP	IP53

9.2.2.3 Desecador termostático al vacío



Tabla de especificaciones 3 Desecador termostático al vacío

MODELO	Ovan – Multimix D 5p (MMH50E)
REFERENCIA	4000474
VACÍO MÁXIMO	3
DIÁMETRO PLACA CALEFACTORA (cm)	23,5
DIMENSIONES (cm)	17x28x34
PESO (kg)	9
CONSUMO (W)	540
TEMPERATURAS REGULABLES (°C)	5 – 170
ESTABILIDAD (°C)	±1
RESOLUCIÓN (°C)	1
TIEMPO	1' hasta 999' en continuo

9.2.2.4 Liofilizadora



Tabla de especificaciones 4 Liofilizadora

MODELO	Telstar LyoQuest -85
VOLTAJE (V)	230
FRECUENCIA (Hz)	50
POTENCIA (W)	1400
DIMENSIONES (cm)	48x42,5x57,5
TEMPERATURA FINAL DEL CONDENSADOR (°C)	<-85
CAPACIDAD FINAL DEL CONDENSADOR DE HIELO (kg)	8 (6 kg / 24 h)
NÚMERO DE COMPRESORES	2
PESO UNIDAD BASE (kg)	70

9.2.2.5 Equipo DSC



Tabla de especificaciones 5 Equipo DSC

MODELO	Perkin Elmer – DSC 8000
RANGO DE TEMPERATURA (°C)	-180 – 750
VELOCIDAD DE CALENTAMIENTO (°C/min)	0,01 – 300
OPCIÓN ALTA PRESIÓN (psi)	600
REFRIGERACIÓN	Nitrógeno líquido

9.2.2.6 Equipo TGA



Tabla de especificaciones 6 Equipo TGA

MODELO	Mettler Toledo – DSC/TGA 2
RANGO DE TEMPERATURA (K)	RT hasta 1873
PRECISIÓN (K)	±0,3
TIEMPO DE CALENTAMIENTO (min)	10 (RT a 1873 K)
TIEMPO DE ENFRIAMIENTO (min)	27 (1873 a 373 K)
TIEMPO DE ENFRIAMIENTO CON HIELO (min)	≤ 13 (1373 a 373 K)
VELOCIDAD DE CALENTAMIENTO (K/min)	100
VELOCIDAD DE ENFRIAMIENTO (K/min)	-20 (≥ 473 K)
VOLUMEN MUESTRA (μL)	≤ 900

9.2.2.7 Microscopio electrónico de barrido de emisión de campo (FESEM)



Tabla de especificaciones 7 FESEM

MODELO	Carl Zeiss – ULTRA 55
RESOLUCIÓN (nm)	1 nm @ 15 kV 1,7 nm @ 1 kV 4 nm @ 0,1 kV
MAGNIFICACIÓN	12 – 900.000x
ESTABILIDAD DEL EMISOR	0,2% / h
ACELERACIÓN DEL VOLTAJE	0,1 – 30 kV
SONDA DE CORRIENTE	4 pA – 10 nA
CÁMARA	330 nm (Ø) x 270 nm (h)
RESOLUCIÓN DE IMÁGENES	3072 x 2304 px
FILTRADO DE TENSIÓN DE RED	0 a 1500 V

9.2.2.8 Microscopio electrónico de barrido (SEM)



Tabla de especificaciones 8 SEM

MODELO	Jeol JSM 6300
RESOLUCIÓN (nm)	Electrones secundarios 3,5 @ 30 kV Elect. retrodispersados 10,0 @ 30 kV
MAGNIFICACIÓN	10 – 300.000x
ESTABILIDAD DEL EMISOR	0,2% / h
ACELERACIÓN DEL VOLTAJE	0,2 – 30 kV
RESOLUCIÓN DE IMÁGENES	1032 x 778px

9.2.2.9 Balanza de precisión



Tabla de especificaciones 9 Balanza de precisión

MODELO	Mettler Toledo – AX205DeltaRange
PRECISIÓN	0,01 mg / 0,1 mg
CARGA MÁXIMA	81,0 g / 220,0 g

9.3 PLIEGO DE PRESCRIPCIONES DE GESTIÓN DE RESIDUOS

9.3.1 GESTIÓN DE RESIDUOS

El Centro de Biomateriales e Ingeniería Tisular (CBIT), como centro en el que se trabaja con productos químicos y biológicos, dispone de un sistema de gestión de residuos. Este sistema está basado en la información proporcionada por el Área de Medio Ambiente de la UPV y cumple con su Normativa respecto a Residuos Peligrosos, que a su vez está regulada por Normativa Estatal y Autonómica. (“Ley 10/1998, de 21 de abril, de residuos”, “Ley 10/2000, de 12 de diciembre, de residuos de la Comunidad Valenciana”, “Real Decreto 833/1988, de 20 de julio, por el que se aprueba el Reglamento para la ejecución de la Ley 20/1986, de 14 de mayo, básica de residuos tóxicos y peligrosos”, “Real Decreto 952/1997, de 20 de junio, así como el resto de normativa aplicable”). La Oficina Verde del Área de Medio Ambiente se encarga de gestionar la recogida y posterior tratamiento de residuos generados en las instalaciones del CBIT, así como de proporcionar los recipientes y etiquetas para la identificación de los residuos, según la clasificación de los mismos.

Los residuos generados en el CBIT pueden dividirse en residuos no peligrosos y residuos peligrosos. Se define como residuo peligroso aquel que debido a su cantidad, concentración o características físicas, químicas y/o biológicas puede suponer una amenaza para la salud o el medioambiente cuando se manipula, almacena, elimina o transporta incorrectamente.

9.3.1.1 Normas básicas para gestión de residuos no peligrosos

Se dispone de los siguientes contenedores para la gestión de residuos no peligrosos:

- Papeleras azules: para los residuos de papel y cartón. Las cajas de cartón se deben dejar totalmente desmontadas a la entrada, para su retirada por el servicio de limpieza.
- Papeleras amarillas: para envases ligeros de plástico (botellas, bolsas, bandejas de corcho blanco), envases metálicos (latas, bandejas de aluminio) y envases tipo brick.
- Papeleras negras: para el reciclado de residuos orgánicos.
- Cajas verdes de Offiservice: los cartuchos de las impresoras, tóner de la fotocopidora y fax, se reciclan en las cajas verdes de Offiservice que están en el Despacho 1 y hall entrada.

9.3.1.2 Normas básicas para gestión de residuos peligrosos

Para la gestión de los residuos peligrosos cada laboratorio dispone, en función de la actividad que se realiza en ellos, de los correspondientes bidones de residuos. Éstos se dejan en el laboratorio hasta su llenado y, posteriormente, se almacenan hasta su recogida.

Todo recipiente que se utilice para almacenar un residuo peligroso debe etiquetarse correctamente en el momento que se utiliza por primera vez, nunca cuando se encuentra lleno. Para ello se dispone de dos etiquetas de identificación; una etiqueta específica indicando el nombre exacto del residuo y una etiqueta, proporcionada por el Área de Medio Ambiente, con el grupo general al que pertenece el residuo y los pictogramas correspondientes, y que debe rellenarse indicando el nombre del centro, edificio donde se ubica, responsable, teléfono de contacto y fecha de envasado.

Como normas generales para el tratamiento de los residuos peligrosos se establece que:

- Está totalmente prohibido tirar residuos de disoluciones o reactivos químicos o biológicos por el fregadero. Solamente las disoluciones acuosas conteniendo sólo ácidos o bases y ningún metal pueden desecharse por el fregadero, siempre y cuando el pH esté comprendido entre 5.5 y 11.0.
- Las disoluciones generadas por el lavado de recipientes que hayan contenido reactivos químicos o biológicos son consideradas también como residuos.
- Los sobrantes de los productos químicos utilizados no se devuelven nunca a los frascos de origen, se vierte en un vaso de precipitados la cantidad aproximada a utilizar y el sobrante se gestiona como residuo.
- Todo envase que haya contenido un reactivo es un residuo y se dejará en el contenedor correspondiente para que el técnico del laboratorio lo gestione.
- Cada residuo generado debe almacenarse según el grupo al que corresponda y nunca deben mezclarse residuos incompatibles en un mismo contenedor. Los productos tóxicos no deben estar próximos a los comburentes y a su vez deben estar alejados de inflamables y peróxidos.
- Es conveniente no llenar más de 2/3 del volumen de los recipientes que contengan los residuos, ya que pueden generarse vapores.
- Los guantes de laboratorio, si están contaminados con restos de productos químicos y/o monómeros, se reciclan en los bidones etiquetados específicamente para este uso. Si no están contaminados con restos de reactivos se dejan en las papeleras negras (nunca en las papeleras amarillas para plástico).
- Los recipientes en los que se almacenen los residuos deben mantenerse herméticamente cerrados en todo momento, excepto durante el trasvase de residuos. Si se usa un embudo este debe retirarse tras el trasvase y se debe dejar sujeto a la tapa del contenedor de residuos para posteriores vertidos.
- Los restos de ácido o base y sus diluciones se neutralizarán inmediatamente después de su uso y en caso de que los productos obtenidos sean tóxicos se gestionarán en los bidones correspondientes.

- En el laboratorio existen recipientes específicos para los residuos punzantes, tales como agujas y cuchillas.
- Todo residuo que haya estado en contacto con monómeros debe introducirse en una bolsa zip perfectamente cerrada antes de dejarlo en el bidón correspondiente.
- Los bidones con residuos de monómeros solamente pueden abrirse debajo de una campana de extracción para el vertido de los residuos.
- Los disolventes se gestionan como disolventes halogenados y no halogenados excepto: acetona de lavado (con PMMA o PEMA disuelto) y etanol de lavado (disolventes no halogenados).
- El cristal de laboratorio roto o contaminado nunca se tirará a la basura, debido al elevado riesgo de cortes del personal de Limpieza. Para ello, se dispone de un bidón específico para este uso.
- Cualquier otro reactivo o mezcla consultar su gestión al Técnico de Laboratorio o al Responsable de Gestión Medioambiental, con anterioridad a su producción, por si es necesario hacer consultas sobre su gestión a la Oficina Verde

10 BIBLIOGRAFÍA

- [1] L. G. Griffith and G. Naughton, "Tissue Engineering -- Current Challenges and Expanding Opportunities." 2002.
- [2] G. Falke and A. Anthony, "Reconstrucción de tejidos y órganos utilizando ingeniería tisular," *Arch argent pediatr*, vol. 98, no. 2, pp. 103–115, 2000.
- [3] J. D. SIPE, "Tissue Engineering and Reparative Medicine," *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, vol. 961, no. 1, pp. 1–9, 2002.
- [4] M. A. Lizarbe, "Sustitutivos De Tejidos: De Los Biomateriales a La Ingeniería Tisular," *Cienc.Exact.Fís.Nat. (Esp)*, vol. 101, no. 1, pp. 227–249, 2007.
- [5] D. F. Williams, "Biomaterials and biocompatibility," *Med. Prog. Technol.*, vol. 4, no. 1–2, p. 31—42, 1976.
- [6] F. J. O'Brien, "Biomaterials & scaffolds for tissue engineering," *Mater. Today*, vol. 14, no. 3, pp. 88–95, Mar. 2011.
- [7] L. Xiao, B. Wang, G. Yang, and M. Gauthier, "Poly(Lactic Acid)-Based Biomaterials : Synthesis , Modification and Applications," *Biomed. Sci. Eng. Technol.*, pp. 247–282, 2006.
- [8] R. R. Martínez Medina and Ó. A. Prada Rodríguez, "DISEÑO Y CONSTRUCCION DE UN LIOFILIZADOR PILOTO PARA EL ESTUDIO DE PROCESOS DE DESHIDRATACION Y CONSERVACION DE PRODUCTOS AGROINDUSTRIALES MEDIANTE SECADO AL VACIO," Universidad Industrial De Santander, 2008.
- [9] L. Qian and H. Zhang, "Controlled freezing and freeze drying: A versatile route for porous and micro-/nano-structured materials," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, vol. 86, no. 2, pp. 172–184, 2011.
- [10] J. W. Kim, K. Taki, S. Nagamine, and M. Ohshima, "Preparation of poly(L-lactic acid) honeycomb monolith structure by unidirectional freezing and freeze-drying," *Chem. Eng. Sci.*, vol. 63, no. 15, pp. 3858–3863, 2008.
- [11] "Servicio General de Apoyo a la Investigación - SAI _ Universidad de Zaragoza." [Online]. Available: <http://sai.unizar.es/liquid-crio/aplicaciones/aplicaciones1.html>.
- [12] F. Guerra Pérez and H. Vallejo Martín, "Acido poliláctico." .
- [13] E. Bardone, A. Brucato, T. Keshavarz, F. F. C. Pavia, S. Rigogliuso, V. La Carrubba, G. A. Mannella, G. Gherzi, V. Brucato, V. La Carrubba, G. A. Mannella, G. Gherzi, V. Brucato, E. Bardone, A. Brucato, T. Keshavarz, F. F. C. Pavia, S. Rigogliuso, V. La Carrubba, G. A. Mannella, G. Gherzi, and V. Brucato, "Poly Lactic Acid Based Scaffolds for Vascular Tissue Engineering," *Chem. Eng. Trans.*, vol. 27, pp. 409–414, 2012.
- [14] P. Jiménez Bonilla, M. Sibaja Ballester, and J. Vega-Baudrit, "SÍNTESIS Y

CARACTERIZACIÓN DE POLI (ÁCIDO L – LÁCTICO) POR POLICONDENSACIÓN DIRECTA , OBTENIDO DEL FERMENTO DE VARIEDAD Cavendish CULTIVAR Gran naine) EN COSTA RICA,” vol. 13, no. 2, pp. 52–59, 2012.

- [15] K. Weissmermel and H.-J. Arpe, “Química orgánica industrial.” Editorial Reverté, 1978.
- [16] “Agencia para Sustancias Tóxicas y el Registro de Enfermedades. 1,4-dioxano.” [Online]. Available: http://www.atsdr.cdc.gov/es/toxfaqs/es_tfacts187.html.
- [17] M. J. Bossingham, N. S. Carnell, and W. W. Campbell, “Water balance, hydration status, and fat-free mass hydration in younger and older adults,” *Am J Clin Nutr*, vol. 81, no. 6, pp. 1342–1350, Jun. 2005.
- [18] Carbajal Azcona A and Gonzales Fernandez M, “Propiedades físicas y químicas del agua,” *Agua*, 2013. [Online]. Available: <https://www.ucm.es/.../458-2013-07-24-Carbajal-Gonzalez-2012-ISBN-9>.
- [19] F. de Q. de la UNAM, “Hoja de seguridad del Etanol.” [Online]. Available: <http://www.quimica.unam.mx/IMG/pdf/12etanol.pdf>.
- [20] S. L. Sistemas de Ensayo, “Máquina de ensayos universal.” [Online]. Available: http://www.sistemasdeensayo.com/pdf/producto_156.pdf.
- [21] T. Hatakeyama, “Thermal Analysis. Fundamentals and applications to polymer science,” 1999.
- [22] E. Freire, “Differential Scanning Calorimetry,” in *Protein Stability and Folding: Theory and Practice*, B. A. Shirley, Ed. Totowa, NJ: Humana Press, 1995, pp. 191–218.
- [23] J. Renau-piqueras and M. Faura, “Principios básicos del Microscopio Electrónico de Barrido,” *Cent. Investig. Hosp. “La Fé,”* pp. 73–92, 1965.
- [24] Politecnico Of Turin, “Field Emission SEM.” [Online]. Available: http://areweb.polito.it/ricerca/carbongroup/fac_fesem.html.
- [25] R. B. Pereira and A. R. Morales, “Study of mechanical and thermal behavior of PLA modified with nucleating additive and impact modifier,” *Polímeros*, vol. 24, pp. 198–202, 2014.
- [26] C. Reyero, J. G. Morcillo, M. Martín, and M. T. Martín, “STUDY OF FACTORS INFLUENCING THE SHAPE AND PROPERTIES OF CRYSTALS,” vol. 4, no. 1, pp. 121–130, 2013.

PRESUPUESTO

11 PRESUPUESTO

En el presente documento se incluye el presupuesto correspondiente a todo el proyecto de inversión que ha supuesto la realización del Trabajo de Fin de Grado, incluyendo el hipotético salario de un Ingeniero Mecánico.

El presupuesto ha sido estructurado de la siguiente manera:

- Tres cuadros de precios, uno para la mano de obra, otro para la maquinaria y el tercero para los materiales
- Una justificación de precios, donde se ha fijado el precio unitario por unidad de obra.
- Un presupuesto parcial, donde se han cuantificado las unidades de obra que unidas formarán el presupuesto de ejecución de material.
- Un presupuesto de ejecución de material y de inversión, donde se suman las unidades de obra del presupuesto parcial y se aplican los impuestos y coeficientes pertinentes para obtener el presupuesto final o de inversión.

Consideraciones previas al presupuesto

1. Las letras “u.m.” corresponden a “unidades de medida”.
2. Para estandarizar las medidas, se han considerado dentro de cada unidad de obra tres tipos de unidad diferentes, estas son:
 - Horas (**h.**), con la que se ha cuantificado el tiempo.
 - Unidades (**ud.**), con la que se ha contado los elementos que no se pueden dividir fungibles.
 - Kilogramos (**kg.**), con la que se ha medido tanto unidades de masa como unidades de volumen, para estandarizar la cantidad de cada reactivo que se utiliza por unidad de obra y porque las disoluciones se hicieron con concentraciones másicas.
3. Para el cálculo de las masas a partir de los volúmenes de los reactivos que venían en fase líquida, se han utilizado las siguientes densidades (todas a 25 °C menos el nitrógeno, que se encontraba a -196 °C):
 - Etanol: 0,789 kg/L
 - N-octano: 0,703 kg/L
 - N₂ líquido: 0,803 kg/L
 - H₂O: 1 kg/L
 - Dioxano: 1,03 kg/L

Tabla de presupuestos 1 Cuadro de mano de obra. (*) Según las tablas salariales para Ingenieros Mecánicos en Valencia a 2015 en el sector del metal

Cuadro de mano de obra

Nº	Designación	Importe		
		Precio (euros/u.m.)	Cantidad (horas)	Total (euros)
1	Ingeniero Mecánico(*)	10,74	680,00	7.300,65
2	Técnico de laboratorio del centro investigador.	12,30	8,00	98,40
3	Técnico de laboratorio de microscopía.	15,00	2,00	30,00
Importe total:				7.429,05

Tabla de presupuestos 2 Cuadro de maquinaria

Cuadro de maquinaria

Nº	Designación	Importe		
		Precio (euros/h)	Cantidad (horas)	Total (euros)
1	Balanza de precisión de 30 x 20 x 9 cm (plato de pesada de 11,5 cm de diámetro) y 4 kg de peso con protector contra ráfagas de aire de vidrio.	0,19	7,50	1,43
2	Agitador magnético con calefacción. Rango de temperatura 30-400 °C y resolución de 10 °C.	0,04	175,00	6,64
3	Congelador -80 °C.	0,02	500,00	11,00
4	Congelador -20 °C.	0,01	96,00	1,15
5	Liofilizadora.	0,12	192,00	22,30
6	DSC (Calorímetro Diferencial de Barrido).	0,57	4,00	2,29
7	TGA (Termogravímetro).	0,92	6,00	5,49
8	Máquina universal de ensayos mecánicos.	0,07	4,00	0,28
9	FESEM (Microscopio electrónico de emisión de campo) Atomizado en oro/platino incluido.	25,00	12,00	300,00
10	SEM (Microscopio electrónico de barrido). Atomizado en oro/platino incluido.	12,50	2,00	25,00
11	Bomba hidráulica.	0,01	6,00	0,05
12	Desecador termostático con vacuómetro. Incluye campana de vidrio templado y juntas de silicona.	0,01	6,00	0,08
13	Prensa de sellado de cápsulas para DSC	0,01	0,50	0,01
Importe total:				375,72

Tabla de presupuestos 3 Cuadro de materiales

Cuadro de materiales

Nº	Designación	Importe		
		Precio (euros/u.m.)	Cantidad empleada	Total (euros)
ELEMENTOS DE PROTECCIÓN INDIVIDUAL				
1	Máscara de gases tipo V de protección de vías respiratoria con filtros de tejido de 0,2 micras de paso y válvula de escape microperforada para permitir la comunicación.	17,99	1,00 ud	17,99
2	Bata blanca de laboratorio mediana de algodón abotonada con 3 bolsillos y cuello abierto.	15,15	1,00 ud	15,15
3	Guante protector térmico naranja para frío con doble aislamiento	4,21	2,00 ud	8,42
4	Caja de 100 guantes de nitrilo de tamaño mediano testados electrónicamente y pretratados térmicamente para facilitar la transpiración.	7,00	2,00 ud	14,00
Subtotal 1:				55,56
MATERIAL DE LABORATORIO				
5	Vaso de precipitados de 100 mL de vidrio borosilicatado con boca en forma de pico	5,40	4,00 ud	21,60
6	Pinzas de acero inoxidable 18/10 antimagnético rectas, de 160 mm de longitud, caras planas y punta rayada.	4,40	9,00 ud	39,60
7	Cuchara de acero inoxidable antimagnético con espátula, autoclavable, de 150 mm de longitud y cuchara de dimensiones 38 x 27 mm.	0,50	2,00 ud	1,00
8	Vial de vidrio de 15 mL.	0,13	30,00 ud	3,90

Nº	Designación	Importe		
		Precio (euros/u.m.)	Cantidad empleada	Total (euros)
9	Frasco ISO de vidrio de 50 mL, boca estrecha y tapón de rosca.	9,31	3,00 ud	27,93
10	Frasco ISO de vidrio de 100 mL, boca estrecha y tapón de rosca.	11,05	2,00 ud	22,10
11	Barra de agitación con núcleo magnético, recubierta de PTFE con los bordes redondeados	1,43	5,00 ud	7,15
12	Abrazadera/soporte para montaje experimental	2,00	1,00 ud	2,00
13	Parafilm transparente	7,68	0,01 m2	0,07
14	Tijeras	2,19	1,00 ud	2,19
15	Cinta adhesiva transparente de 12 mm de ancho	1,00	1,00 ud	1,00
16	Martillo de mango de madera de 250 mm con cabezal circular de doble maza	4,35	1,00 ud	4,35
17	Cilindro de aluminio de 5 mm de diámetro para troquelar.	0,80	1,00 ud	0,80
18	Estropajo de poliuretano.	7,70	2,00 ud	15,40
19	Cepillo de crin, con mango de rosca de hierro galvanizado flexible.	11,60	2,00 ud	23,20
20	Pinza/abrazadera metálica de con tres puntos de agarre en extremo acolchados con plástico y varilla de 25mm.	7,32	1,00 ud	7,32
21	Caja de poliestireno expandido grande con tapa	2,54	1,00 ud	2,54
22	Caja de poliestireno expandido pequeña sin tapa	1,96	1,00 ud	1,96
23	Placa de 100 cm2 de aluminio de 2 mm de grosor	1,20	1,00 ud	1,20
24	Pipeta graduada 25 mL	5,60	1,00 ud	5,60
25	Pipeta graduada 10 mL	3,80	1,00 ud	3,80
26	Pipeteador 25 mL	16,28	1,00 ud	16,28
27	Pipeteador 10 mL	14,78	1,00 ud	14,78
28	Vaso Dewar 4 L	180,75	2,00 ud	361,50
29	Cristalizador teflón pequeño	20,45	3,00 ud	61,35
30	Vaso de precipitados 250 mL teflón con boca con forma de pico	39,82	4,00 ud	159,28

Nº	Designación	Importe		
		Precio (euros/u.m.)	Cantidad empleada	Total (euros)
31	Tubo de ensayo de 100 mm de altura y 15 de diámetro	0,18	15,00 ud	2,70
32	Pinza de madera	2,43	2,00 ud	4,86
33	Vaso de teflón 500 mL	45,76	5,00 ud	228,80
34	Escalpelo de hoja intercambiable	6,73	1,00 ud	6,73
35	Cápsulas aluminio para DSC	0,10	10,00 ud	1,00
36	Pie de rey	14,12	1,00 ud	14,12
37	Aguja	0,50	1,00 ud	0,50
38	Jeringuilla 10 ml sin enclave	0,36	1,00 ud	0,36
39	Placa Petri de vidrio de 140 mm de diámetro	0,66	4,00 ud	2,64
Subtotal 2:				1.069,11
<i>REACTIVOS</i>				
40	Nitrógeno líquido.	23,94	26,45 kg	633,26
41	Acetona 99,5% en base acuosa	5,99	10,00 kg	59,91
42	Etanol absoluto (>99,6%) líquido	4,83	5,79 kg	27,93
43	Agua desionizada y destilada en una etapa	2,58	7,98 kg	20,59
44	Cloruro sódico.	0,20	>0,01 kg	>0,01
45	Detergente de pH neutro sin fosfatos ni silicatos.	13,50	0,04 kg	0,54
46	1,4-dioxano	58,06	0,18 kg	10,45
47	Ácido poli-L-láctico granulado industrial	16,00	0,01 kg	0,23
48	N-octano	102,99	0,04 kg	2,64
Subtotal 3:				755,56
Importe total:				1.880,23

Justificación de precios

Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
1 Preparación de disoluciones				
1.1 PDMA	ud	Material auxiliar de laboratorio para preparar disoluciones.		
	2,00 ud.	Cuchara de acero inoxidable antimagnético con espátula, autoclavable, de 150 mm de longitud y cuchara de dimensiones 38 x 27 mm.	0,50	1,00
	1,00 ud.	Pinzas de acero inoxidable 18/10 antimagnético rectas, de 160 mm de longitud, caras planas y punta rayada.	4,40	4,40
	5,00 ud.	Barra de agitación con núcleo magnético, recubierta de PTFE, con los bordes redondeados.	1,43	7,15
	4,00 ud.	Vaso de precipitados de 100 mL de vidrio borosilicatado con boca en forma de pico	5,40	21,60
	2,00 ud.	Frasco ISO de vidrio de 100 mL, boca estrecha y tapón de rosca.	11,05	22,10
	3,00 ud.	Frasco ISO de vidrio de 50 mL, boca estrecha y tapón de rosca.	9,31	27,93
	1,00 ud.	Pipeta graduada 25 mL	5,60	5,60
	1,00 ud.	Pipeta graduada 10 mL	3,80	3,80
	1,00 ud.	Pipeteador 25 mL	16,28	16,28
	1,00 ud.	Pipeteador 10 mL	14,78	14,78
	1,00 ud.	Tijeras	2,19	2,19
Precio total por ud.				126,83

Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
1.2	kg	Preparación de disoluciones Dioxano+PLLA		
PDPDDP				
	15,32 h.	Balanza de precisión de 30 x 20 x 9 cm (plato de pesada de 11,5 cm de diámetro) y 4 kg de peso con protector contra ráfagas de aire de vidrio.	0,19	2,91
	766,09 h.	Agitador magnético con calefacción. Rango de temperatura 30-400 °C y resolución de 10 °C.	0,04	29,08
	0,92 kg.	1,4-dioxano	58,06	53,38
	0,07 kg.	Ácido poli-L-láctico granulado industrial	16,00	1,15
	0,01 kg.	Agua desionizada y destilada en una etapa	2,58	0,02
	0,03 m2.	Parafilm transparente	7,68	0,20
		Precio total por kg.		86,74
1.3	kg	Preparación de disoluciones H2O+NaCl.		
PDPDHN				
	24,29 h.	Balanza de precisión de 30 x 20 x 9 cm (plato de pesada de 11,5 cm de diámetro) y 4 kg de peso con protector contra ráfagas de aire de vidrio.	0,19	4,62
	48,58 h.	Agitador magnético con calefacción. Rango de temperatura 30-400 °C y resolución de 10 °C.	0,04	1,84
	0,97 kg.	Agua desionizada y destilada en una etapa	2,58	2,51
	0,03 kg.	Cloruro sódico.	0,20	0,01
	0,10 m2.	Parafilm transparente	7,68	0,75
		Precio total por kg.		9,73

Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
1.4	kg	Mezcla de disoluciones (Diox+PLLA)+(H2O+NaCl)		
PDMDDPN				
		6.464,21 h. Agitador magnético con calefacción. Rango de temperatura 30-400 °C y resolución de 10 °C.	0,04	245,37
		0,54 m2. Parafilm transparente	7,68	4,14
		Precio total por kg.		249,51
Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
		2 Congelación de disoluciones		
2.1	ud	Material auxiliar de laboratorio para congelación de disoluciones.		
CDMA				
		2,00 ud. Pinza de madera	2,43	4,86
		Pinza/abrazadera metálica de con tres puntos de agarre en extremo acolchados con plástico y varilla de 25mm.		
		1,00 ud.	7,32	7,32
		3,00 ud. Vaso de precipitados 250 mL teflón con boca con forma de pico	39,82	119,46
		6,00 ud. Cristalizador teflón	20,45	122,70
		1,00 ud. Vaso Dewar 4 L	180,75	180,75
		1,00 ud. Caja de poliestireno expandido grande con tapa	2,54	2,54
		1,00 ud. Caja de poliestireno expandido pequeña sin tapa	1,96	1,96
		1,00 ud. Placa de 100 cm2 de aluminio de 2 mm de grosor	1,20	1,20
		4,00 ud. Pinzas de acero inoxidable 18/10 antimagnético rectas, de 160 mm de longitud, caras planas y punta rayada.	4,40	17,60

Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
		30,00 ud. Vial de vidrio de 15 mL.	0,13	3,90
		1,00 ud. Abrazadera/soprote para montaje	2,00	2,00
		15,00 ud. Tubo de ensayo de 100 mm de altura y 15 de diámetro	0,18	2,70
		Precio total por ud.		466,99
2.2 CDCM	kg	Congelación de las muestras		
		1,00 kg. Nitrógeno líquido.	23,94	23,94
		Precio total por kg.		23,94
2.3 CDMMC	h	Manutención de las muestras congeladas		
		1,00 h. Congelador -80 °C.	0,02	0,02
		Precio total por kg.		0,02
Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
		3 Freeze-Extraction		
3.1 FEMA	ud	Material auxiliar para la freeze-extraction		
		1,00 ud. Pinzas de acero inoxidable 18/10 antimagnético rectas, de 160 mm de longitud, caras planas y punta rayada.	4,40	4,40
		5,00 ud. Vaso de teflón 500 mL	45,76	228,80
		4,00 ud. Placa Petri de vidrio de 140 mm de diámetro.	0,66	2,64
		Precio total por ud.		235,84
3.2 FELM	kg	Lavado de las muestras		
		1,00 kg. Etanol absoluto (>99,6%) líquido	4,83	4,83
		25,35 h. Congelador -20 °C.	0,01	0,30
		Precio total por kg.		5,13

Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
3.2 FESM	h	Secado de las muestras		
		Desecador termostático con vacuómetro.		
	1,00 h.	Incluye campana de vidrio templado y juntas de silicona.	0,01	0,01
	1,00 h.	Bomba hidráulica.	0,01	0,01
		Precio total por h.		0,02
Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
		4 Freeze-Drying		
4.1 FDMA	ud	Material auxiliar para el freeze-drying		
		Pinzas de acero inoxidable 18/10 antimagnético rectas, de 160 mm de longitud, caras planas, borde rugoso para mejor sujeción y punta rayada.		
	1,00 ud.		4,40	4,40
	3,00 ud.	Cristalizador teflón pequeño	20,45	61,35
	1,00 ud.	Vaso Dewar 4 L	180,75	180,75
	1,00 ud.	Vaso de precipitados 250 mL teflón con boca con forma de pico	39,82	39,82
	1,00 ud.	Cinta adhesiva transparente de 12 mm de ancho	1,00	1,00
		Precio total por ud.		287,32
4.2 FDL	h	Liofilización		
	1,00 h.	Liofilizadora.	0,12	0,12
	0,05 kg.	Nitrógeno líquido.	23,94	1,21
	0,01 h.	Técnico de laboratorio del centro investigador.	12,30	0,13
		Precio total por h.		1,46

Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
5 Caracterización de los scaffolds				
5.1 CSMA	ud	Material auxiliar para la caracterización de scaffolds		
	2,00 ud.	Pinzas de acero inoxidable 18/10 antimagnético rectas, caras planas y punta rayada.	4,40	8,80
	1,00 ud.	Escalpelo de hoja intercambiable	6,73	6,73
	1,00 ud.	Martillo de mango de madera de 250 mm con cabezal circular de doble maza	4,35	4,35
	1,00 ud.	Caja de poliestireno expandido pequeña sin tapa	1,96	1,96
	1,00 ud.	Martillo de mango de madera de 250 mm con cabezal circular de doble maza	4,35	4,35
	1,00 ud.	Pie de rey	14,12	14,12
	1,00 ud.	Jeringuilla 10 ml sin enclave	0,36	0,36
	1,00 ud.	Aguja	0,50	0,50
	10,00 ud.	Cápsulas aluminio para DSC	0,10	1,00
Precio total por ud.				42,17
5.2 CSDSC	h	DSC		
	1,00 h.	DSC (Calorímetro Diferencial de Barrido). Balanza de precisión de 30 x 20 x 9 cm (plato de pesada de 11,5 cm de diámetro) y 4 kg de peso con protector contra ráfagas de aire de vidrio.	0,57	0,57
	0,38 h.	Técnico de laboratorio del centro investigador.	0,19	0,07
	0,25 h.	Prensa de sellado de cápsulas para DSC	12,30	3,08
	0,13 h.		0,01	>0,01
Precio total por h.				3,73

Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
5.3 CSTGA	h	TGA		
	1,00 h.	TGA (Termogravímetro). Balanza de precisión de 30 x 20 x 9 cm (plato de pesada de 11,5 cm de diámetro) y 4 kg de peso con protector contra ráfagas de aire de vidrio.	0,92	0,92
	0,08 h.	Técnico de laboratorio del centro investigador.	0,19	0,02
	0,17 h.		12,30	2,05
		Precio total por h.		2,99
5.4 CSEC	h	Ensayo de compresión		
	1,00 h.	Máquina universal de ensayos mecánicos.	0,07	0,07
	0,25 h.	Técnico de laboratorio del centro investigador.	12,30	3,08
		Precio total por h.		3,15
5.5 CSM	h	Microscopía		
	1,00 h.	FESEM (Microscopio electrónico de emisión de campo) Atomizado en oro/platino incluido.	25,00	25,00
	0,17 h.	SEM (Microscopio electrónico de barrido). Atomizado en oro/platino incluido.	12,50	2,08
	0,10 kg.	Nitrógeno líquido.	23,94	2,41
	0,08 h.	Técnico de laboratorio de microscopia.	15,00	1,25
		Precio total por h.		30,74

Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
5.6 CSCD	kg	Cálculo de densidad		
		1,000 kg. N-octano	102,99	102,99
		47,416 h. Balanza de precisión de 30 x 20 x 9 cm (plato de pesada de 11,5 cm de diámetro) y 4 kg de peso con protector contra ráfagas de aire de vidrio.	0,19	9,01
		Precio total por kg.		112,00
Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
		6 Limpieza del material del laboratorio		
6.1 LMLMA	ud	Material auxiliar de limpieza.		
		2,000 ud. Estropajo de poliuretano.	7,70	15,40
		2,000 ud. Cepillo de crin, con mango de rosca de hierro galvanizado flexible.	11,60	23,20
		Precio total por ud.		38,60
6.2 LMLL	kg	Limpieza de todo el material usado en los experimentos.		
		0,398 kg. Agua desionizada y destilada en una etapa	2,58	1,03
		0,500 kg. Acetona 99,5% en base acuosa	5,99	3,00
		0,100 kg. Etanol absoluto (>99,6%) líquido	4,83	0,48
		0,002 kg. Detergente de pH neutro sin fosfatos ni silicatos.	13,50	0,03
		Precio total por kg.		4,54

Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
7 Equipos de protección individual y seguridad				
7.1 EPEPS	ud	Equipos de protección individual.		
	1,00 ud.	Bata blanca de laboratorio mediana de algodón abotonada con 3 bolsillos y cuello abierto.	15,15	15,15
	1,00 ud.	Máscara de gases tipo V de protección de vías respiratoria con filtros de tejido de 0,2 micras de paso y válvula de escape microperforada para permitir la comunicación.	17,99	17,99
	2,00 ud.	Caja de 100 guantes de nitrilo de tamaño mediano testados electrónicamente y pretratados térmicamente para facilitar la transpiración.	7,00	14,00
	2,00 ud.	Guante protector térmico naranja para frío con doble aislamiento	4,21	8,42
Precio total por ud.				55,56
Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
8 Reuniones				
8.1 RTL	h	Asesoramiento en el uso de equipos, normas de seguridad del laboratorio y gestión de residuos.		
	1,000 h.	Técnico de laboratorio del centro investigador.	12,30	12,30
Precio total por h.				12,30

Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
8.2 RTM	h	Asesoramiento en el uso de las instalaciones de microscopía, normas de seguridad y asistencia en la preparación de muestras.		
		1,000 h. Técnico de laboratorio de microscopía.	15,00	15,00
		Precio total por h.		15,00
Nº	Ud	Descripción	€/u.m.	Total €
		9 Mano de Obra Directa		
9.1 MOD	h	Ejecución del proyecto, tanto dentro del laboratorio, como en el tratamiento de la información.		
		1,000 h. Ingeniero técnico industrial	10,74	10,74
		Precio total por h.		10,74

Tabla de presupuestos 5 Presupuesto parcial

Presupuesto parcial					
Presupuesto parcial nº 1 Preparación de disoluciones					
Núm. Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
1.1 PDMA	ud	Material auxiliar de laboratorio para preparar disoluciones.	1,00	126,83	126,83
1.2 PDPDDP	kg	Preparación de disoluciones Dioxano+PLLA	0,20	86,74	16,98
1.3 PDPDHN	kg	Preparación de disoluciones H2O+NaCl.	0,02	9,73	0,20
1.4 PDMDDPN	kg	Mezcla de disoluciones (Diox+PLLA)+(H2O+NaCl)	0,01	249,51	0,93
Total presupuesto parcial nº 1 Preparación disoluciones:					144,94
Presupuesto parcial nº 2 Congelación de disoluciones					
Núm. Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
2.1 CDMA	ud	Material auxiliar de laboratorio para congelación de disoluciones.	1,00	466,99	466,99
2.2 CDCM	kg	Congelación de las muestras	15,57	23,94	372,79
2.3 CDMMC	h	Manutención de las muestras congeladas	500,00	0,02	11,00
Total presupuesto parcial nº 2 Congelación disoluciones:					850,78
Presupuesto parcial nº 3 Freeze-extraction					
Núm. Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
3.1 FEMA	ud	Material auxiliar para la freeze-extraction	1,00	235,84	235,84
3.2 FELM	kg	Lavado de las muestras	3,79	5,13	19,43
3.2 FESM	h	Secado de las muestras	6,00	0,02	0,13
Total presupuesto parcial nº 3 Freeze-extraction:					255,40

Presupuesto parcial nº 4 Freeze-drying					
Núm. Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
4.1 FDMA	ud	Material auxiliar para el freeze-drying	1,00	287,32	287,32
4.2 FDL	h	Liofilización	192,00	1,46	280,32
Total presupuesto parcial nº 4 Freeze-drying:					567,64

Presupuesto parcial nº 5 Caracterización de los scaffolds					
Núm. Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
5.1 CSMA	ud	Material auxiliar para la caracterización de scaffolds	1,00	42,17	42,17
5.2 CSDSC	h	DSC	4,00	3,73	14,92
5.3 CSTGA	h	TGA	6,00	2,99	13,41
5.4 CSEC	h	Ensayo de compresión	4,00	3,15	17,94
5.5 CSM	h	Microscopia	12,00	30,74	368,88
5.6 CSCD	kg	Cálculo de densidad	0,04	112,00	4,72
Total presupuesto parcial nº 5 Caracterización de los scaffolds:					462,04

Presupuesto parcial nº 6 Limpieza del material de laboratorio					
Núm. Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
6.1 LMLMA	ud	Material auxiliar de limpieza.	1,00	38,60	38,60
6.2 LMLL	kg	Limpieza de todo el material usado en los experimentos.	20,00	4,54	90,80
Total presupuesto parcial nº 6 Limpieza del material del laboratorio:					129,40

Presupuesto parcial nº 7 Equipos de protección individual y seguridad					
Núm. Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
7.1 EPEPS	ud	Equipos de protección individual.	1,00	55,56	55,56
Total presupuesto parcial nº 7 Equipos de protección individual y seguridad:					55,56

Presupuesto parcial nº 8 Reuniones					
Núm. Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
8.1 RTL	h	Asesoramiento en el uso de equipos, normas de seguridad del laboratorio y gestión de residuos.	3,00	12,30	36,90
8.2 RTM	h	Asesoramiento en el uso de las instalaciones de microscopia, normas de seguridad y asistencia en la preparación de muestras.	1,00	15,00	15,00
Total presupuesto parcial nº 8 Reuniones:					51,90

Presupuesto parcial nº 9 Mano de Obra Directa					
Núm. Código	Ud	Descripción	Cantidad	Precio (€)	Total (€)
9.1 MOD	h	Ejecución del proyecto, tanto dentro del laboratorio, como en el tratamiento de la información.	680,00	10,74	7303,20
Total presupuesto parcial nº 9 Mano de Obra Directa:					7303,20

Presupuesto de ejecución material y de inversión

Proyecto: Síntesis y caracterización de propiedades físico-químicas de soportes celulares porosos basados en ácido poliláctico para aplicaciones de ingeniería tisular

Capítulo		Importe (€)
Capítulo 1	Preparación de disoluciones	144,94
Capítulo 2	Congelación de disoluciones	850,78
Capítulo 3	<i>Freeze-extraction</i>	255,40
Capítulo 4	<i>Freeze-drying</i>	567,64
Capítulo 5	Caracterización de los <i>scaffolds</i>	462,04
Capítulo 6	Limpieza del material del laboratorio	129,40
Capítulo 7	Equipos de protección individual y seguridad	55,56
Capítulo 8	Reuniones	51,90
Capítulo 9	Mano de Obra Directa	7.303,20
Presupuesto de ejecución material		9.820,5
10% de gastos generales		982,05
Suma		10.802,55
6% de beneficio industrial		648,15
Presupuesto Total de Proyecto		11.450,70
21% IVA		2.404,65
Presupuesto de Inversión		13.855,35

Asciende el presupuesto de inversión final a la expresada cantidad de **TRECE MIL OCHOCIENTOS CINCUENTA Y CINCO EUROS CON TRENTA Y CINCO CÉNTIMOS**